

10/552485  
Res'd PET/PTO 06 OCT 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 0 月 2 9 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 3 1 5 0 6 0

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 3 1 5 0 6 0

出 願 人  
Applicant(s): エーザイ株式会社

BEST AVAILABLE COPY

2 0 0 5 年 1 1 月 3 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 E1-A0404Y1  
【提出日】 平成16年10月29日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12Q 01/068  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺栗田町9-3番地 京都リサーチパーク  
    サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内  
    【氏名】 坂本 佳正  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺栗田町9-3番地 京都リサーチパーク  
    サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内  
    【氏名】 尾野 雄一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺栗田町9-3番地 京都リサーチパーク  
    サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内  
    【氏名】 今井 俊夫  
【発明者】  
    【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺栗田町9-3番地 京都リサーチパーク  
    サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内  
    【氏名】 中川 康子  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000000217  
    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100102978  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100108774  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 橋本 一恵  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2004-213743  
    【出願日】 平成16年 7月22日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 041092  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ。

- (1) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列
- (2) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
- (3) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
- (4) 配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列
- (5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列

【請求項2】

ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項1記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項3】

以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択する方法。

- (1) 請求項2記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する工程
- (2) 上記(1)において選択された増殖前駆細胞を培養する工程
- (3) 上記(2)において培養された細胞を、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーを利用してスクリーニングする工程

【請求項4】

請求項2の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞。

【請求項5】

ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的遺伝子及び増殖前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項4記載の増殖前駆細胞、または該増殖前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

【請求項6】

成熟を指標としたドーパミン産生ニューロン系列の細胞の増殖及び/または分化を調節する化合物のスクリーニング方法であり、請求項4記載の増殖前駆細胞、または該増殖前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による増殖前駆細胞若しくは前駆細胞の変化を検出する工程を含む方法。

【請求項7】

以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体。

- (1) 配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド
- (2) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (3) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (4) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (5) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド
- (6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド

【請求項8】

ハイブリドーマ(FERM P-20120またはFERM P-20121)により産生される、請求項7記載の抗体。

【請求項9】

請求項7または8記載の抗体からなる、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカー抗体。

【請求項10】

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法であって、請求項7～9のいずれか一項に記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項11】

以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択する方法。

(1) 請求項10記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程

(2) 上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程

(3) 上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

【請求項12】

請求項10記載の方法により選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞。

【請求項13】

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項12記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

【請求項14】

成熟を指標としたドーパミン産生ニューロン系列の細胞の増殖及び/または分化を調節する化合物のスクリーニング方法であり、請求項12記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

【請求項15】

請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む、パーキンソン病を治療するための薬剤。

【請求項16】

請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、パーキンソン病の治療方法。

【請求項17】

請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の、パーキンソン病を治療するための薬剤を製造するための使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】Lrp4/Corinドーバミン産生ニューロン前駆細胞マーカー

【技術分野】

【0001】

ドーバミン産生ニューロン前駆細胞(progenitor)特異的な遺伝子として膜貫通蛋白質をコードするLrp4を同定した。Lrp4 mRNAはドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞に、Lrp4蛋白質は分裂停止前後の細胞を含むドーバミン産生ニューロン前駆細胞に、特異的に発現していることが確認された。そこで本発明は、パーキンソン病(PD)等の神経変性疾患の移植治療において用いることができるドーバミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することを可能にする、Lrp4/Corinドーバミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを検出するためのポリヌクレオチドプローブ及び抗体、並びに、それらを用いた前駆細胞の選択方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ドーバミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーバミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病(PD)は、中脳黒質のドーバミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である(HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE第2巻 第23版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp. 2275-7)。パーキンソン病の治療法としては、産生されるドーバミン量の低下を補うためにL-DOPA(3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)を経口投与する方法が主に採られているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

【0003】

パーキンソン病治療において、最近では失われたドーバミン産生ニューロンを補うために、ドーバミン産生ニューロン前駆細胞を含む6~9週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている(特許文献1;非特許文献1~6)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

【0004】

倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法も提案されている(例えば、特許文献2~4参照)。この方法においては、拒絶反応を抑制するため、細胞表面上の抗原(MHCクラスI抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セルトリー細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特許文献5~6、及び非特許文献7)。MHCがマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。

【0005】

そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES細胞)、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からのin vitroにおけるドーバミン産生ニューロンの分化系の移植材料としての利用が有望視されている。実際、ラットパーキンソン病モデルの病変線条へのES細胞移植により機能的なドーバミン産生ニューロンが形成されたとの報告もある(非特許文献8)。将来的にはES細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくるものと思われる。

【0006】

神経組織の損傷の治療においては脳機能の再構築が必要となり、周囲の細胞と適切に

ネットワーク形成)のために成熟した細胞ではなくニューロンへとin vivoにおいて分化し得る細胞を移植する必要がある。ニューロン前駆細胞の移植において上述した供給面以外で問題となるのは、前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。例えば、パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(非特許文献3及び9)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特許文献7~9)、NT2Z細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特許文献10)、ニューロン始原細胞(特許文献11)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髄ストロマ細胞(特許文献12~13)、遺伝子改変されたES細胞(非特許文献8)等が挙げられる。その他、胎児中脳組織由来の神経前駆細胞をFGF-8及びShhに接触させることにより形成されたドーパミン産生ニューロン(特許文献14)、及びNT2神経細胞をレチノイン酸で処理することによりチロシン水酸化酵素を発現するようになった細胞(特許文献15)を用いることも提案されている。しかしながら、いずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

【0007】

未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンハイドロキシラーゼ(TH)等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特許文献16)が提案されている。この方法は、外来遺伝子の導入という煩雑な工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題である。

【0008】

【特許文献1】米国特許第5690927号

【特許文献2】特表平10-508487号公報

【特許文献3】特表平10-508488号公報

【特許文献4】特表平10-509034号公報

【特許文献5】特表平11-509170号公報

【特許文献6】特表平11-501818号公報

【特許文献7】特表平8-503215号公報

【特許文献8】特表平11-506930号公報

【特許文献9】特表2002-522070号公報

【特許文献10】特表平9-5050554号公報

【特許文献11】特表平11-509729号公報

【特許文献12】特表2002-504503号公報

【特許文献13】特表2002-513545号公報

【特許文献14】米国特許第6277820号

【特許文献15】国際公開第00/06700号

【特許文献16】特開2002-51775号公報

【非特許文献1】Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8

【非特許文献2】Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55

【非特許文献3】Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63

【非特許文献4】Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 118-24

【非特許文献5】Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50

【非特許文献6】Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80

【非特許文献7】Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9

【非特許文献8】Kim et al. (2002) Nature 418: 50-56

【非特許文献9】Lindvall et al. (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

現時点でのPD移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域、及び、*in vitro*で分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞のいずれもが多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましい。また、腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存、及び正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

そこで、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに2つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法(N-RDA: representational difference analysis法; RDA(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7)の改良(「DNA断片の量の均一化方法及びサブトラクション法」(W02002/103007パンフレット))により同定した。その結果、分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現する遺伝子の一つとして、新規遺伝子65B13の単離に成功した(W02004/038018パンフレット)。さらに、単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしていた(図1)。

【0011】

Lrp4 mRNAは、中脳では腹側中心部に特異的に発現し、その領域はドーパミン産生ニューロンの増殖前駆細胞の存在する領域と一致する。さらに、Lrp4とドーパミンニューロンのマーカーであるTHの発現と比較すると、両者のシグナルは背腹方向の位置は一致するものの、重ならない(図4及び6)。これにより、分裂を停止し、神経管外層に移動した前駆細胞ではLrp4 mRNAは発現していないことが示された。従って、Lrp4 mRNAを指標とすることにより、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を特異的に検出・選択することができる。

【0012】

そこで、本発明は、Lrp4 mRNAを特異的に検出できるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ、及び、該プローブを利用したドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法を提供するものである。さらに、本発明は、このようなヌクレオチドプローブを用いて選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、並びに、該増殖前駆細胞を利用した、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からのドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。また、本発明のヌクレオチドプローブを用いて選択された該増殖前駆細胞を培養し、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得ることもできる。ここで、ドーパミン産生ニューロン系列の細胞とは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞及び/またはドーパミン産生ニューロンをいう。ドーパミン産生ニューロン系列の細胞もまた、ドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に利用することができる。よって、本発明は、本発明のヌクレオチドプローブを用いて選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を培養しドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得る方法、このようにして得られた細胞、該細胞を用いたドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。

### 【0013】

さらに、抗Lrp4抗体を作製し、Lrp4蛋白質の発現について調べた。まず、組織内での発現について確認したところ（図8）、Lrp4 mRNAと同様に発現していることが確認された。この実験では、TH発現領域でもLrp4蛋白質のシグナルが検出されたが、増殖前駆細胞は神経管最外層に向けて突起を伸展しているため、このシグナルが突起上の蛋白質を検出した結果であるのか、またはTH発現細胞もLrp4蛋白質を発現しているのかを区別することができなかった。次に、抗Lrp4抗体を用い、Lrp4蛋白質が細胞表面に発現していることをFACS解析で確認した。Lrp4 mRNAの発現が確認されたES細胞をin vitroで分化誘導（SDIA法）した細胞をサンプルとした。その結果、Lrp4蛋白質が確かに細胞表面に発現していることが確認された（図9）。このような細胞表面に発現している蛋白質を分離マーカーとして利用すれば、細胞を生きた状態で選択することができ特に望ましい（図15参照）。

### 【0014】

そこでさらに、SDIA誘導細胞及びマウス胎児中脳腹側細胞より、抗Lrp4抗体を用いてセルソーターによるLrp4陽性細胞の分離を行った。分離された細胞について、RT-PCR法による遺伝子発現の解析を行ったところ、ニューロン増殖前駆細胞マーカーであるNestinの発現が認められたが、さらに分裂停止後のニューロンマーカーであるMAP2を発現する細胞も含まれることが明らかとなった（図10）。また、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーであるNurr1及びTHが、Lrp4陽性細胞集団において陰性細胞集団と比べて高レベルに発現されていた。従って、Lrp4蛋白質を指標として抗体を用いて細胞の選択を行った場合、Lrp4 mRNAを指標とする場合と異なり、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞を単離することができる。

### 【0015】

よって、本発明は、Lrp4蛋白質を特異的に検出する抗体、及び、該抗体を利用したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法を提供するものである。さらに、本発明は、このような抗体を用いて選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、並びに、該前駆細胞を利用した、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。また、本発明の抗体を用いて選択された該前駆細胞を培養し、その他の分化段階のドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得ることもできる。このような細胞もまた、ドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に利用することができる。よって、本発明は、本発明の抗体を用いて選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養しドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得る方法、このようにして得られた細胞、該細胞を用いたドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法にも関する。

### 【0016】

さらに本発明者らは、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて分離したLrp4発現細胞を、パーキンソン病モデルマウス線状体に移植した。その結果、移植したマウスの線状体内にEGFP陽性細胞が認められたことから（表1）、移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、パーキンソン病モデルマウスの線状体において、生着しているものと考えられる。また、生着したほとんどの細胞は、成熟したニューロンのマーカーであるMAP2陽性であり、EGFP陽性の軸索が線状体内に長く伸展している様子も認められた（表1および図16）。移植したLrp4タンパク質陽性細胞が神経前駆細胞であったのに対し、生着したほとんどの細胞が成熟した神経細胞へと分化および成熟したこと、これら生着した細胞の約20%はTH陽性であったことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞の少なくとも一部は、ドーパミン産生ニューロンへと分化したことが強く示唆された。したがって、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、脳内に移植することによってドーパミン産生ニューロンへの分化が可能であり、パーキンソン病の治療に有効であると考えられる。すなわち、本



発明は、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む、パーキンソン病を治療するための薬剤、および、該ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、パーキンソン病の治療方法にも関する。

#### 【発明の効果】

##### 【0017】

Lrp4は胎生期から成人期にかけての心臓に発現しており、血圧調整ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の切断を行うと考えられているII型膜貫通プロテアーゼである。ANPは前駆型であればpro-ANPの状態に発現し、細胞外に分泌された後にLrp4より細胞膜表面上で切断され、活性型ANPとなると考えられている。これまで、増殖中のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で特異的に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子は報告されていない。細胞膜表面に発現するLrp4蛋白質に対する抗体は、Lrp4発現細胞の分離に非常に効果的であると考えられる。例えば、抗Lrp4抗体を用いて、中脳腹側領域または*in vitro*で分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養細胞から、Lrp4発現細胞を分離することで、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる(図15)。

##### 【0018】

さらに、該前駆細胞をそのまま、または*in vitro*で増殖させた後に移植することも可能である。本発明の前駆細胞は脳内の最適な領域で分化成熟していく可能性や*in vivo*でさらに増殖する可能性もあり、長期的な治療効果が期待できる。また、Lrp4発現細胞を*in vitro*で分化、成熟させた後に移植を行えば、*in vivo*で何らかの理由でドーパミン産生ニューロンへの分化が行われない場合にも、治療効果が期待できる。腫瘍化等の危険性を考慮すれば、*in vitro*で増殖させたLrp4発現細胞を分化誘導した後に、65B13等の分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカー(WO2004/038018パンフレット)を用いて分離した細胞を移植すれば、より高い安全性が期待できる。いずれの方法でも、Lrp4発現細胞を分離して移植治療に用いることで、目的の細胞種のみを分離しているので安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞を用いることができるため、生存率やネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。分離直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果が得られない場合があったとしても、本発明のマーカーにより分離される前駆細胞は*in vitro*で培養する等して成熟させることもできるため、最適な分化段階の材料を調製することを可能にするものである(図6)。

##### 【0019】

一方、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることは、ドーパミン産生ニューロンに特異的な遺伝子の単離等、パーキンソン病治療のターゲット探索にも有効である。特に増殖前駆細胞を得られるということは、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の研究や、成熟を指標にしたスクリーニング系だけでなく、前駆細胞を*in vitro*または*in vivo*で増殖させる薬剤のスクリーニング、及び、*in vivo*で前駆細胞から分化を誘導する薬剤(*in vivo*での再生治療薬剤)のスクリーニング等にも有用である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0020】

#### ＜マーカーポリヌクレオチドプローブ＞

本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択及び/または検出するマーカーとして使用されるものである。該プローブとして使用されるポリヌクレオチドは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞において検出される、配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列を含むものである。配列番号:1はマウスLrp4 cDNAの塩基配列、そして配列番号:2はヒトLrp4 cDNAの塩基配列であり、それぞれGenBankに登録された配列である(マウス:Accession No. NM-016869;ヒト:Accession No. XM-035037)。

##### 【0021】

ここで、「マーカーポリヌクレオチドプローブ」とは、Lrp4の発現、特に転写されたmRNAを検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖cDNAも組織*in situ*ハイブリダイゼー

ションでプローブとして利用可能であることが知られており、本発明のマーカにはそのような二本鎖cDNAも含まれる。組織中のRNAの検出において特に好ましいプローブとなるマーカポリヌクレオチドプローブとしては、RNAプローブ(リボプローブ)を挙げることができる。また、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 $\beta$ -D-ガラクトシルキエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N<sup>6</sup>-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 $\beta$ -D-マンノシルキエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン、N-((3- $\beta$ -D-リボフラノシル-2-メチルリオブリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((3- $\beta$ -D-リボフラノシルブリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((3- $\beta$ -D-リボフラノシルブリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでもよい。

#### 【0022】

さらに、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブは、Lrp4蛋白質をコードする配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を含む。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号:1または2に記載された塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1または2記載の配列とは異なる塩基配列を含むものである。本発明のマーカポリヌクレオチドプローブはまた、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において、膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に対して相補的な配列を含むものを包含する。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列中、シグナル配列は存在せず、マウスLrp4(配列番号:3)では113-135アミノ酸残基、ヒトLrp4(配列番号:4)では46-68アミノ酸残基の部分が膜貫通領域を形成している。なお、配列番号:3及び4に記載の配列も各々GenBankに登録されている(ヒト:XP-035037、マウス:NP-058565)。

#### 【0023】

ここで、或る「塩基配列に対して相補的」とは、塩基配列が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上(例えば、97%または99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT(RNAの場合はU)、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして或るポリヌクレオチド同士の塩基配列レベルでの相同性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいた塩基配列についてのプログラムとして、BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)が開発されており、マーカポリヌクレオチドプローブ配列の相同性の決定に使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

#### 【0024】

さらに、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブには、配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチドが包含される。Lrp4については配列番号:1または2で示

される塩基配列を有するものが公知であるが、そのアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体に相補的な配列を有するものも本発明のマーカーポリペプチドとして利用することができる。このようなアイソフォーム及びアレリック変異体は、配列番号1または2の塩基配列を含むポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを利用してもよい。

#### 【0025】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、Lrp4を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、A GPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込む。

#### 【0026】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、50℃」、「2×SSC、0.1% SDS、42℃」、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、63℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げるにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、Lrp4のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

#### 【0027】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection6.3-6.4)、『DNA Cloning I: Core Techniques, A Practical Approach 2<sup>nd</sup> ed.』(Oxfo

rd University (1995);条件については特にSection2.10等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1または2の塩基を含む塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、上述の相同性の決定と同様にBLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。上述の塩基配列についてのプログラムBLASTNの他に、このアルゴリズムに基づいたアミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてBLASTX(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、利用可能である。具体的な解析方法については先に挙げたように、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

#### 【0028】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、Lrp4のアイソフォームやアレリック変異体等、Lrp4と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから、配列番号:1または2に記載の塩基配列を基に設計したプライマーを利用して得ることができる。

#### 【0029】

ポリヌクレオチドの塩基配列は、慣用の方法により配列決定して確認することができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等による確認が可能である。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

#### 【0030】

さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、上記(1)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な配列、及び(4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列の各塩基配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。

#### 【0031】

このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 mRNAの発現を検出するためのプローブ、増幅して検出を行うためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。

#### 【0032】

本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、Lrp4を発現する細胞より上述のハイブリダイゼーション法、PCR法等により調製することができる。また、Lrp4の公知の配列情報に基づいて、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは化学合成により製造することもできる。特に組織中のRNAの検出に好ましいとされるリボプローブは、例えば、プラスミドベクターpSP64にクローニングしたLrp4遺伝子またはその一部を逆方向に挿入し、挿入した配列部分をランオフ転写することにより得ることができる。pSP64はSP6プロモーターを含むものであるが、その他、ファージT3、T7プロモーター及びRNAポリメラーゼを組合せてリボプローブを作成する方法も公知である。

### 【0033】

#### <抗体>

本発明により、ドーバミン産生ニューロン前駆細胞を脳組織、または培養細胞より選択するために利用することができる、ドーバミン産生ニューロン前駆細胞マーカー抗体が提供される。Lrp4 mRNAと異なり、Lrp4ポリペプチドは、分裂停止前のドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞のみならず、分裂停止後のドーバミン産生ニューロン前駆細胞にも発現していることから、該ポリペプチドに対する本発明の抗体を用いることにより、分裂停止前後のドーバミン産生ニューロン前駆細胞を選択・取得するために利用することができる。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV)(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5379-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol. 113, Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 113-32; Millstein and Cuelllo (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造することにより二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変してもよい。

### 【0034】

本発明の抗体は、(1)配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド、(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、(5)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド、並びに(6)前記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチドのいずれかに対して特異的な抗体である。

### 【0035】

特に好ましい本発明の抗体として、実施例4において使用された2種の抗Lrp4抗体及びその断片を含む改変体を挙げることができる。該2種の抗体は、下記の各受領番号で寄託されている。

(1)寄託機関の名称・あて名

名称：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-3566)

(2)受託日：2004年7月14日

(3)受託番号：FERM P-20120及びFERM P-20121

### 【0036】

本発明の抗体は、Lrp4ポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として利用することにより製造することができる。また、Lrp4ポリペプチドの短い断片はウシ血清アルブミン、キーホールリンベットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合した形で免疫原として用いてもよい。また、Lrp4のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

### 【0037】

本発明における「Lrp4ポリペプチド」はペプチド重合体であり、配列番号:3または4記

載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。Lrp4ポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。さらに、Lrp4ポリペプチドには膜貫通領域部分を欠く蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質が含まれる。

#### 【0038】

本発明において、Lrp4ポリペプチドは、Lrp4ポリペプチドの抗原性を有すればよく、配列番号13または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを包含する。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である(Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。そして、このような配列番号13または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するLrp4の抗原性を維持したポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを公知の『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997):特にSection8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製し、適宜発現させることにより得ることができる。

#### 【0039】

Lrp4ポリペプチド断片は、上記Lrp4ポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも8アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 $\alpha$ ヘリックス及び $\alpha$ ヘリックス形成領域、 $\alpha$ 両親媒性領域、 $\beta$ シート及び $\beta$ シート形成領域、 $\beta$ 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片がLrp4のポリペプチド断片に含まれる。本発明におけるLrp4のポリペプチド断片は、Lrp4ポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性/親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-500684号公報)等により確認することができる。

#### 【0040】

Lrp4ポリペプチド、及びポリペプチド断片は、Lrp4を発現する細胞・組織等を原料として、その物理的性質等に基づいて単離することができる。また、公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することもできる。例えば、Lrp4ポリペプチドをin vitroで製造する場合、in vitroトランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な宿主細胞を選択し該ベクターによる形質転換を行い、形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。

#### 【0041】

適当なベクターとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターを挙げることができる(Molecular

Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。ベクターは、導入された宿主細胞内で所望のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列を有し、ポリヌクレオチドは該制御配列下に結合される。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。ベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドとして、異種蛋白質由来のシグナルペプチドを利用することができる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAGまたはTGA)の挿入を行ってもよい。

#### 【0042】

in vitroにおけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST(Promega)を例示することができる。また、原核細胞宿主における発現に適した種々のベクターが公知であり(「微生物学基礎講座3 遺伝子工学」(共立出版)等参照)、原核細胞を宿主として選択した場合、当業者であれば選択した宿主に適したベクター、ベクターの宿主への導入方法を適宜選ぶことができる。その他、酵母等の真菌類、高等植物、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、種々の培養系細胞(COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, Bowesメラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero, Namalwa, Namalwa KJM-1, HBT5637(特開昭63-299号公報)等)もLrp4ポリペプチド及びその抗原性断片を発現させる宿主として利用することができ、各細胞に適したベクター系、ベクターの宿主細胞への導入手法も公知である。さらに、動物の生体内(Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54等参照)、及び植物体において外来蛋白質を発現させる方法も公知でありLrp4ポリヌクレオチドを発現させるために利用することができる。

#### 【0043】

ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。また必要に応じ、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高い塩基配列を選択し、Lrp4ポリペプチドコード発現ベクターを設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 743-74)。Lrp4ポリペプチドを産生する宿主は、Lrp4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものであるが、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になければよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

#### 【0044】

宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM(Virology 8: 336 (1959)、MEM(Science 122: 501 (1952))、RPM 11640(J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

#### 【0045】

通常、遺伝子組換え技術により製造されたLrp4ポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物の回収を行う。そして、蛋白質の精製

方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈殿、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈殿等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、例えば、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。Lrp4ポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。

#### 【0046】

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、Lrp4ポリペプチドに対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。さらに、精製したポリペプチドを必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用いて修飾することも可能である。一方、Lrp4のポリペプチド断片は、上述のLrp4ポリペプチドと同じような合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いてLrp4ポリペプチドを切断して製造することもできる。

#### 【0047】

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択するためのポリクローナル抗体は、例えば、上述のようにして精製されたLrp4のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カンクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

#### 【0048】

また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール (PEG) 等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法 (Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46) に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞が挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液 (HAT培養液) で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。



#### 【0049】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03913; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

#### 【0050】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1983) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

#### 【0051】

抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をババイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al. (1994) J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7参照)。

#### 【0052】

多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一面部分を単離する方法(Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161参照)。

#### 【0053】

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、抗体以外のポリペプチドの製造の場合と同様に上記した蛋白質精製技術によっても行い得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1983))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

#### 【0054】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法により測定する場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いでLrp4ポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリホスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore (Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

#### 【0055】

##### <ドーバミン産生ニューロン前駆細胞の選択方法>

本発明により分裂停止前のドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択的に均一な集団として選択する方法が提供された。分裂停止前のドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞は、特に本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブを用いることにより選択することができる。さらに、本発明により分裂停止前後の細胞を含むドーバミン産生ニューロン前駆細胞を選択的に均一な集団として選択される方法が提供された。分裂停止前後の細胞を含むドーバミン産生ニューロン前駆細胞は、特に本発明の抗体を用いて好適に選択することができる。このように本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いることにより、最終的にドーバミンを産生するニューロンへと分化するドーバミン産生ニューロン系列の細胞が特異的に選択される。

#### 【0056】

ここで、「選択」という用語は、或る試料中のマーカーを発現する細胞の存在を検出すること、及び、存在を検出しさらに分離または単離することの両方を含むものである。より具体的には、本発明は、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブとドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法を提供するものである。該方法においては、マーカーポリヌクレオチドプローブを好ましくは放射性同位体または非放射性化合物で標識しておく。例えば、標識するための放射性同位体としては、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 等を挙げることができる。放射標識したマーカーポリヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルジョンオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカーと結合するRNAを検出することができる。また、マーカーポリヌクレオチドプローブ標識のための非放射性同位体としては、ビオチン、ジゴキシゲニン等が例示される。ビオチン標識マーカーの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識マーカーの検出には、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することができる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカー位置に沈着させることで検出を行う。特に蛍光を利用した、in situハイブリッド形成法 (FISH) が簡便であり、特に好ましいものである。

#### 【0057】

また、本発明により、本発明のドーバミン産生ニューロン前駆細胞を選択するための抗体とドーバミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーバミン産生ニューロンの選択方法が提供される。即ち、ドーバミン産生ニューロン前駆細胞を含むことが予測される細胞試料と本発明の抗体とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することでLrp4ポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止前後の細胞を含むドーバミン産生ニューロン前駆細胞を取得できる (図13参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されて

いる場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。その他、例えば、磁性粒子を抗体に結合し、該抗体及び抗体に結合したLrp4を細胞表面上に発現している細胞を、磁石を利用して回収することもできる。また、セルソーター、及び蛍光等により標識した抗Lrp4抗体を使用して、フローサイトメトリーによりLrp4を発現するドーパミン産生ニューロンを選択することもできる。

#### 【0058】

さらに、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養し若しくは培養無しで、さらに分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーを用いてスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることもできる。分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーとしては、例えば65B13、Nurr1、TH等を挙げることができる（W02004/033018; Kawasaki et al. (2000) Neuron 23: 31-40; Wallen et al. (1999) Exp. Cell Res. 253: 737-46）。例えば、65B13ポリペプチドに対する抗体を、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択し、さらに必要に応じ培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と接触させて65B13ポリペプチドを発現している細胞を選択することにより分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することができる。また、65B13はIgドメイン接着分子様の構造を有する。培養細胞中で65B13発現させた場合、65B13を発現させた細胞同士は接着するのに対し、65B13を発現させていない細胞とは接着しない。そのため、65B13を介した接着はホモフィリックな結合と考えられている。そこで、65B13ポリペプチドの細胞外領域部分の接着を利用した65B13発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞のスクリーニングも可能である。

#### 【0059】

Lrp4発現ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞及び65B13発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択及び/またはスクリーニングは、各々Lrp4または65B13に対するプロモーターを利用して行うこともできる（例えば、特開2002-51775号公報参照）。例えば、後述するLrp4の発現領域解析により得られるプロモーター部分に対し、GFP等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、Lrp4遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。65B13についてもLrp4と同様の方法によりスクリーニングが可能である。65B13については、例えば、W02004/033018に記載の配列を参照することができる。

#### 【0060】

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、またはin vitroで分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養細胞である。in vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知のES細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不活化セルライン（特表平8-509215号公報；特表平11-506930号公報；特表2002-522070号公報）、ニューロン始原細胞（特表平11-509729号公報）等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細胞を誘導する方法も知られている（特表平10-509319号公報）。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告もある（特表2002-530068号公報）。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、これらを含む如何なる方法により分離または培養された細胞群であってもよい。

#### 【0061】

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シ

リカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

#### 【0062】

<ドーパミン産生ニューロン前駆細胞、該細胞を含むパーキンソン病の治療剤およびパーキンソン病の治療方法>

ポリヌクレオチドプローブを用いLrp4 mRNAの発現を指標として獲得された細胞は分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞であり、抗体を用いLrp4ポリペプチドの発現を指標として獲得された細胞は分裂停止前後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞であり、mRNAまたはポリペプチドのどちらを指標とした場合であっても、ドーパミンニューロン系列のみの細胞集団が得られる。本発明の方法により取得された前駆細胞は、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で姿勢反射、運動、及び報酬関連行動(reward-associated behaviors)に関わる疾患、特に、PD等の神経変性疾患、精神分裂病、及び薬物嗜癖(Hynes et al. (1995) Cell 80: 95-101)の移植治療に好ましいものである。Lrp4の発現を指標として獲得された細胞は、そのまま、またはin vitroで増殖させた後に移植に使用することができる(図13)。このような細胞は、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性があることから治療効果が期待される。すなわち、本発明は、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む、パーキンソン病を治療するための薬剤および、該細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、パーキンソン病の治療方法をも提供する。

#### 【0063】

さらに、本発明のLrp4 mRNAの発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、増殖中の前駆細胞でありin vivoにおいてさらに増殖する可能性があることから、より長期的な治療効果が期待される。さらに、Lrp4を指標とした本方法により得られた本発明の細胞(群)は、in vitroにおいて培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。例えば、前述したように、Lrp4の発現を指標として選択された細胞について、さらに細胞分裂停止直後のドーパミン産生ニューロンマーカー(例えば、65B13、Nurr1、TH等)を指標とした選択を行うことにより、より移植の上では安全性の高い細胞を得ることもできる。

#### 【0064】

本発明の方法により得られたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個の細胞を移植する。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

#### 【0065】

さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、パーキンソン病治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

#### 【0066】

<遺伝子発現レベルの比較>

本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。ま

た、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

#### 【0067】

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞in situハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNAドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写PCR、RNase保護アッセイ、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE: serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7)等により行うことができる。

#### 【0068】

細胞in situハイブリダイゼーションでは、特定のRNA配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総RNAまたはpolyA<sup>+</sup>RNAに対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞におけるRNAのプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNAの大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA転写産物をin situで視覚的に捉えることも可能であり(Femino et al. (1993) Science 280: 535-90)、本発明において利用することができる。

#### 【0069】

遺伝子発現の解析で逆転写PCRを用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1つのRNA転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写PCRにおいてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写PCRを行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じるmRNAアイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明のPCRを利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

#### 【0070】

DNAチップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNAチップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたはDNAクローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対するcDNAクローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNAを得る。次に、得られたcDNA試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識cDNA中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識cDNAとチップ上のcDNAクローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を表す蛍光シグナルの強度は、標識cDNA内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

#### 【0071】

また、縮重PCRプライマーを用いた逆転写PCRを行うmRNAディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定

のmRNAのpolyA尾部に3'末端の1または2つの塩基を変更した修飾オリゴdTプライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した総RNAに対して逆転写酵素反応を行う(Liang et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-75)。変更した塩基が「C」であれば、polyA尾部の直前にCを持つmRNAを選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TCを直前に持つmRNAを増幅することができる。次に、第2のプライマーとして、10塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴdTプライマー及び第2のプライマーを使用してPCR増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現しているmRNA由来のcDNAは、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

#### 【0072】

SAGE分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞よりpolyA<sup>+</sup>RNAを慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴdTプライマーを用い、前記RNAをcDNAに変換し、4塩基認識制限酵素(アンカー用酵素:AE)で処理する。これにより、AE処理断片はその3'末端にビオチン基を含んだ形となる。次に、AE処理断片をストレプトアビジンに結合させる。結合されたcDNAを2画分に分け、それぞれの画分を別々の2本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A及びBに連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する1本鎖突出部、(2)タグ用酵素(lagging enzyme:TE)となるIIS型制限酵素(認識部位より20bp以下の離れた定位置の切断を行う)の5'塩基認識配列、及び(3)PCR用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結したcDNAをタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態でcDNA配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる2種類のプールを互いに連結し、リンカーA及びBに特異的プライマーを使用してPCR増幅する。その結果、増幅産物はリンカーA及びBに結合した2つの隣接配列タグ(ダイタグ:ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当するmRNAの存在を同定することができる。

#### 【0073】

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。まず、本発明の前駆細胞のうち試験する細胞のDNA試料を調製する(以下、テストDNAと呼ぶ)。次に、比較する細胞のDNA(以下、ドライバーDNAと呼ぶ)を調製する。テストDNAとドライバーDNAとを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テストDNAに存在し、ドライバーDNAに存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテストDNA及び大過剰量のドライバーDNAを混合し、変性させ一本鎖DNAとした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA中には存在しない特異的な配列をテストDNA由来のDNAのみからなる二本鎖DNAとして単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1954及び Yasunaga et al. (1999) *Nature Genet.* 21: 363-9等を参照することができる。

#### 【0074】

RDA法は、PCRを利用した、ドライバーDNAに存在しないテストDNA中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いる

ことができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7 及び Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4を参照することができる。

#### 【0075】

以上のようにして検出、単離されたドーバミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

#### 【0076】

〈前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング〉

本発明により、本発明のドーバミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーバミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーバミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。本発明のドーバミン産生ニューロン前駆細胞としては、本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択される細胞、及び、これらの細胞を増殖・分化誘導して得られる細胞が挙げられる。

#### 【0077】

ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

#### 【0078】

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーバミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

#### 【0079】

〈Lrp4の発現領域解析〉

Lrp4の発現制御領域は、Lrp4の遺伝子配列を利用してゲノムDNAから公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコール、東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社(1995) pp.362-374)が公知であり、利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の5'末端の15~100bp、好ましくは30~50bpをプローブDNAとして利用して、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号1または2の塩基全部またはその1部)。このようにして得られるクローンは、10kbp以上の5'非翻訳領域を含むものである。次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、Lrp4の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

#### 【0080】

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network等のプログラム(<http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html>; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.html>; Prestridge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、用いることができる。

#### 【0081】

このようにして単離された、Lrp4遺伝子の発現領域は、in vivoで分裂停止前のドーバ

ミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

#### 【0082】

##### 〈Lrp4に対するリガンド〉

Lrp4ポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。Lrp4は、分裂停止前後のドーバミン産生ニューロン前駆細胞で発現されていることから、前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられる。従って、Lrp4に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーバミン産生ニューロンの*in vivo*、*ex vivo*及び*in vitro*における分化を制御するのに利用できる可能性がある。Lrp4ポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、Lrp4ポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、Lrp4ポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋め込まれた状態に発現させたりして用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

#### 【0083】

##### 〈Lrp4の発現抑制〉

本発明により、Lrp4 mRNAが分裂停止前のドーバミン産生ニューロン増殖前駆細胞で一過性に発現されることが明らかにされたことから、Lrp4が前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられた。従って、Lrp4遺伝子の発現を阻害するものは、ドーバミン産生ニューロンの*in vivo*、*ex vivo*及び*in vitro*における分化を制御するのに利用できる可能性がある。遺伝子の発現を阻害し得るものとして、例えば、アンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNA(small interfering RNA: siRNA)が挙げられる。従って、本発明はこのようなアンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNAを提供するものである。

#### 【0084】

アンチセンスが標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生物化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

#### 【0085】

本発明のLrp4アンチセンス核酸は、上述の(1)~(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは



95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、Lrp4ポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1938) *Nucleic Acids Res.* 16: 3209-21)等により調製することができる。

#### 【0086】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small ribozyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるlRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) *Nature* 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 675); 菊地洋(1992) *化学と生物* 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990) *蛋白質核酸酵素* 35: 2191; Koizumi et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992) *化学と生物* 30: 112)。

#### 【0087】

本発明のアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

#### 【0088】

1998年に、線虫においてRNA同士が邪魔し合い動きを失う現象(RNA干渉)が観察された(Fire et al. (1998) *Nature* 391: 806-11)。RNA干渉とは、二本鎖の人工RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有するRNAが分解される現象である。その後の研究により、RNA干渉等のRNAサイレンシングの現象は、欠陥を持つmRNAの排除、並びにトランスポゾン、ウイルス等の寄生体に対する防御のための細胞機構であることが示唆されている。現在では、多くの遺伝子の発現を抑制するためのツールとして、二本鎖RNA(small interfering RNA; siRNA)が利用されており、病気の原因遺伝子等の発現抑制をsiRNAを用いて行うことにより病気を治療・予防する方法も検討されている。本発明のsiRNAは、Lrp4のmRNAの転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNAは、標的mRNAの配列に対するセンス鎖及びアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも10個から標的mRNAと同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15~75個、より好ましくは18~50個、さらに好ましくは20~25個のヌクレオチド長である。

#### 【0089】

Lrp4発現を抑制するために、siRNAは公知の方法により細胞に導入することができる。例えば、siRNAを構成する二本のRNA鎖を、一本鎖上にコードするDNAを設計し、該DNAを発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNAをヘアピン構造を有する二本鎖RNAとして細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的にsiRNAを産生するプラスミド発現ベクターも設計されている(例えば、RNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech))。

#### 【0090】

siRNAの塩基配列は、例えば、Ambion website(<http://www.ambion.com/techlib/misc/s>

iRNA-finder.html)のコンピュータプログラムを用いて設計することができる。機能的s iRNAをスクリーニングするためのキット(例えば、BD Knockout RNAi System(BD Biosciences Clontech))等も市販されており利用可能である。

#### 【実施例】

##### 【0091】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明をいかなる意味でも限定するものではない。

##### 【0092】

#### 【実施例1】ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに二つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

##### 【0093】

#### (1)N-RDA法

##### (1)-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 $\mu$ Mに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacclacatcattccgt (配列番号:5)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:6)

ad3S: gtccatcttctctctcagactctggt (配列番号:7)

ad3A: accagagctcca (配列番号:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtggt (配列番号:9)

ad4A: acacactcacag (配列番号:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagcagt (配列番号:11)

ad5A: actgtcacacig (配列番号:12)

ad13S: gtccatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:13)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:14)

##### 【0094】

#### (1)-2. cDNA合成

日本SLCより入手したマウス12.5日胚より中脳腹側を切り出し、さらに背腹方向に2つの領域に切り分けた。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素RsaIで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして、15サイクルのPCRでcDNAを増幅した。増幅条件は72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を15サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

10 $\times$ ExTaq	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	4 $\mu$ l
ExTaq	0.25 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer	0.5 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
蒸留水	38.25 $\mu$ l

##### 【0095】

#### (1)-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDN

Aを精製し、RsaI消化した。1回のサブトラクションに3 $\mu$ gずつ使用した。

【0096】

(1)-4. Testerの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRsaI消化cDNAにad3を付加した。

【0097】

(1)-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 $\mu$ lに溶解した。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 $\mu$ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

【0098】

ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで増幅した後(72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を10サイクル行った)、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。さらに13サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を13サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

【0099】

(1)-6. 均一化

サブトラクション1回目で増幅したcDNA 3ngに2xPCR buffer 1 $\mu$ lを加えた。93℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 $\mu$ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

【0100】

ハイブリダイズさせたcDNAをRsaIで消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。これをad3Sをプライマーとして11サイクルのPCRで増幅した後(94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を11サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした)RsaIで消化し、ad4を付加した。

【0101】

(1)-7. サブトラクション2回目

上記6でad4を付加したcDNA 20ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad5を付加した。

【0102】

(1)-8. サブトラクション3回目

上記7でad5を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad13を付加した。

【0103】

(1)-9. サブトラクション4回目

上記8でad13を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、以下、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅したcDNAをpCR11 (Invitrogen)にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

【0104】

[実施例2] Lrp4遺伝子の発現解析

次に、Lrp4遺伝子を用いて以下のプロトコールによりin situハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

【0105】

まず、マウス12.5日胚をOCTで包埋し、厚さ16 $\mu$ mの新鮮凍結切片を作製した。スライド

ガラス上で乾燥させた後に4%PFAで室温30分間固定した。PBSで洗浄した後、ハイブリダイゼーション ( $1\mu\text{g/ml}$  DIG化RNAプローブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS,  $50\mu\text{g/ml}$  yeast RNA,  $50\mu\text{g/ml}$  Heparin) を65度で40時間行った。その後、洗浄 (50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を65度で行い、RNase処理 ( $5\mu\text{g/ml}$  RNase) を室温5分間行った。0.2xSSCで65度の洗浄、1xTBSTで室温の洗浄ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBST、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

#### 【0106】

in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、Lrp4 mRNAは中脳から後脳、脊髄にかけての腹側中心部に特異的発現していることが示された。後脳から脊髄にかけては、Shh mRNAと同様の発現パターンを示し、オーガナイザー領域である底板 (floor plate) に特異的であることが明らかになった (図2及び5)。中脳ではShh mRNA発現領域の中でもより中心部にのみ発現が見られた (図3及び5)。

#### 【0107】

ニューロンの成熟マーカーであるNCAM mRNAと比較した結果、Lrp4 mRNA発現細胞はNCAM mRNA陰性の脳室領域 (Ventricular Zone (VZ)) 内の増殖前駆細胞であった。さらにドーパミンニューロンのマーカーであるTH mRNAの発現と比較すると、TH mRNAは外套層 (mantle layer (ML)) にのみ発現しているの、同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸方向での発現領域は完全に一致していた (図3及び5)。一般に神経管 (neural tube) 内の神経細胞は、まずVZ内で増殖し、分化開始とともに分裂を停止し、その後すぐ外側のMLに移動したのちに成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆細胞は、TH発現領域のすぐ内側のVZ内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してからTH mRNAを発現すると考えられる。即ち、Lrp4 mRNAは中脳ではドーパミン産生ニューロンの前駆細胞に特異的に発現すると考えられる (図4及び6)。

#### 【0108】

#### 【実施例3】 ES細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロンにおけるLrp4の発現

次にES細胞をin vitroでドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合にLrp4が発現するかどうか検討した。

#### 【0109】

まず、SDIA法 (Kawasaki et. al. (2000) Neuron 28(1): 31-40) によりES細胞よりドーパミンニューロンへの分化誘導を行った (図7上参照)。誘導後4、6、8、10、12日後にそれぞれ細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを回収し、RT-PCRを行った。RT-PCRにおいては、最初に $1\mu\text{g}$ のtotal RNAに対して、RNA PCR kit (TaKaRa) を用いてcDNA合成を行った。このうち10ng、1ng、0.1ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10X ExTaq	2 $\mu\text{l}$
2.5mM dNTP	1.6 $\mu\text{l}$
ExTaq	0.1 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$ プライマー	各0.2 $\mu\text{l}$
cDNA	1 $\mu\text{l}$
蒸留水	14.9 $\mu\text{l}$

#### 【0110】

94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を35サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

#### 【0111】

Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG (配列番号:15)/CAGAGTGAACCCAGTGGACATATCTG (配列番号:16)

TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTGACAGTTGG (配列番号:17)/GAAGCTGGAAGCCTCCAGGTGTTCC (配列番号:18)

号:18)

DAT: CTCCGAGCAGACACCATGACCTTAGC (配列番号:19)/AGGAGTAGGGCTTGTCTCCCAACCTG (配列番号:20)

#### 【0112】

そして、RT-PCRによる発現解析の結果、Lrp4はES細胞 (CCE) およびストローマ細胞 (PAG) には発現していないが、分化誘導の結果、THと同様に4日目から発現が誘導されることが明らかになった (図8)。従って、胎児中脳由来のドーパミン産生ニューロン前駆細胞だけでなく、in vitroでES細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分離する際にもLrp4はマーカーとして有用である。

#### 【0113】

##### [実施例4] Lrp4タンパク質の発現解析

次にLrp4遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を用いて、以下のプロトコールにより抗Lrp4抗体を作製し、免疫組織染色による発現解析を行った。

#### 【0114】

まず、Lrp4遺伝子のうち、細胞外領域 (161-502アミノ酸) をコードする遺伝子配列を293E細胞に遺伝子導入して、Lrp4タンパク質の細胞外領域を発現させて回収した。回収したタンパク質をハムスターに免疫したのち、リンパ球細胞を取り出してミエロマ細胞とフュージョンさせた。フュージョンさせた細胞を培養し、その培養上清を得た。次にマウス12.5日胚を4%PFA/PBS(-)で4℃、2時間固定したのち、20%ショ糖/PBS(-)で4℃、一晚置換し、OCTで包埋した。厚さ12μmの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(-)で再び湿潤させた。その後、ブロッキング (10% normal donkey serum、10% normal goat serum/ブロックエース) を室温、20分間行い、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体 (FERM P-20120、およびFERM P-20121を混合して用いた (培養上清1/4希釈ずつ、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS)) および抗TH抗体 (Chemicon、0.7μg/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS) を室温、1時間反応させた後、さらに4℃、一晚反応させた。0.1%Triton X-100/PBS(-)で、室温、10分間の洗浄を4回行った。Cy3標識抗ハムスターIgG抗体、FITC標識抗マウスIgG抗体、(Jackson、10μg/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS) を室温、1時間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS(-)によって室温、10分間洗浄し、封入した。

#### 【0115】

そして、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色による発現解析の結果、in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と同様に、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、中脳腹側に発現が認められた (図8)。ドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTHタンパク質の発現と比較すると、Lrp4タンパク質はTHタンパク質が発現する中脳最腹側のVZ側に発現していることから、Lrp4タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられた。

#### 【0116】

次に、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の検出を行った。

#### 【0117】

まず、SDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー (Invitrogen) を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、抗Lrp4モノクローナル抗体 (FERM P-20120、およびFERM P-20121を混合して用いた (培養上清1/4希釈ずつ、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地)) で4℃、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地で4℃、3分間の洗浄を3回行い、ビオチン標識抗ハムスターIgG抗体 (Jackson、10μg/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地) で4℃、20分間染色し、同様に洗浄したのち、PE標識ストレプトアビジン (Pharmingen、20μg/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地) で4℃、20分間染色し、同様に洗浄した。染色後、フローサイトメーターにてLrp4発

現細胞を検出した。

#### 【0118】

そして、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の検出の結果、Lrp4タンパク質を発現する集団を検出した(図9)。固定・透過処理することなく、Lrp4タンパク質発現細胞を検出できることから、セルソーターを付属したフローサイトメーターを用いることにより、Lrp4タンパク質発現細胞を生細胞の状態で分離することが可能であると考えられた。Lrp4タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられることから、Lrp4抗体はドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離に有用であると考えられた。

#### 【0119】

##### [実施例5] 抗体によるLrp4発現細胞の分離

次に抗Lrp4抗体を用いて分離したLrp4タンパク質陽性細胞の性状を解析した。

#### 【0120】

まず、E12.5マウス胎児中脳腹側領域、およびSDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、実施例4と同様の方法で抗Lrp4抗体で染色し、セルソーターによりLrp4陽性細胞および陰性細胞を分離した。分離直後の細胞からRNeasy mini kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを回収、cDNAを合成し、実施例1と同様の方法でcDNAを増幅して、RT-PCRの鋳型に用いた。増幅cDNA 4ng、0.4 ng、0.04ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10×ExTaq	1 μl
2.5mM dNTP	0.8 μl
ExTaq	0.05 μl
100 μM プライマー	各0.1 μl
cDNA	1 μl
蒸留水	6.95 μl

#### 【0121】

94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を26サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。  
以下の配列のプライマーを使用した。

#### 【0122】

Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG (配列番号:15)/CAGAGTGAACCCAGTGGACATATCTG (配列番号:16)

TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTGAGAGTTGG (配列番号:17)/ GAAGCTGGAAGCCTCCAGGTCTTCC (配列番号:18)

Nurr1: CACTCCTGTGTCTAGCTGCCAGATGC (配列番号:21)/AGTGCGAACACCGTAGTGCTGACAGG (配列番号:22)

Nestin: GATGAAGAAGAAGGAGCAGAGTCAGG (配列番号:23)/ATTCAGTTGCTCTGACTCCAGGTTGG (配列番号:24)

MAP2: CCATGATCTTTCCCTCTGGCTTCTG (配列番号:25)/TTTGGCTGGAAGGGTGAAGTCTGAGG (配列番号:26)

#### 【0123】

そして、RT-PCRによる発現解析の結果、予想通り、増殖前駆細胞マーカーであるNestinの発現が認められたが、Lrp4タンパク質陽性細胞集団中に、分裂停止後のマーカーであるMAP2を発現する細胞も含まれることが明らかになった(図10)。したがって、Lrp4タンパク質の発現はmRNAの発現停止後にも維持されており、Lrp4タンパク質はドーパミンニューロン増殖前駆細胞だけでなく、分裂停止後のドーパミンニューロンを分離するためのマーカーとしても有用であることが明らかになった(図11)。さらに、分裂停止後ドーパミンニューロンマーカーであるNurr1やTHが、Lrp4陰性集団に比べて高レベルに発現していたことから、確かにLrp4陽性細胞がドーパミンニューロン系列の前駆細胞であることも確認された(図10)。

#### 【0124】

次に、Lrp4抗体で分離したLrp4タンパク質陽性細胞集団中にどの程度の割合で増殖前駆細胞と分裂停止後前駆細胞が含まれるのかを検討した。

#### 【0125】

分離した細胞をpoly-L-ornithine (Sigma, 0.002% in PBS)、laminin (Invitrogen, 5  $\mu$ g/ml in PBS)、fibronectin (Sigma, 5  $\mu$ g/ml in PBS) コートしたスライドガラス上に播き、40分間、37℃、N2 (Invitrogen, 1x)、B27 (Invitrogen, 1x)、アスコルビン酸 (Sigma, 200 $\mu$ M) BDNF (Invitrogen, 20ng/ml) / SDIA分化培地培地中でインキュベートして付着させた。付着した細胞を4%PFA/PBSで4℃、20分間固定し、PBSで4℃、10分間の洗浄を2回行った。その後、0.3% Triton X-100/PBSで室温、15分間の透過処理を行い、10% normal donkey serum/ブロックエースで室温、20分間のブロッキングを行った。続いて、抗nestin抗体 (Chemicon, 2  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)、抗 $\beta$ III-tubulin抗体 (BABC0, 1/2000、0.5  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で、室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晚反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、Cy5標識した抗ラビットIgG抗体 (いずれもJackson, 10  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、PBSで室温、5分間洗浄し、封入して観察した。

#### 【0126】

また、分離した細胞を同様にスライドガラス上に播き、上記の培地にBrdU (Roche, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, 1x) を添加した培地中で、37℃、18時間培養した後、同様にブロッキングまで行い、2N HClで37℃、20分間反応させた後、PBSで3回洗浄し、抗BrdU抗体、DNase (Roche, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, 1x conc. in incubation buffer) で37℃、30分間反応させた。さらに、抗BrdU抗体 (Sigma, 44  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晚反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、(Jackson, 10  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、封入して観察した。

#### 【0127】

そして、マーカー染色の結果、Lrp4陽性細胞の多くはNestin陽性の増殖前駆細胞であり、一部が分裂停止後マーカー $\beta$ III-tubulin陽性であることが明らかになった (図12)。また、分離した細胞は高頻度にBrdUを取り込み、実際にin vitroで増殖することが確認された (図13)。

#### 【0128】

次に、分離したLrp4陽性細胞がドーパミン産生ニューロンに分化することを確認した。

分離した細胞をpoly-L-ornithine (Sigma, 0.002% in PBS)、laminin (Invitrogen, 5  $\mu$ g/ml in PBS)、fibronectin (Sigma, 5  $\mu$ g/ml in PBS) コートしたスライドガラス上に播き、N2 (Invitrogen, 1x)、B27 (Invitrogen, 1x)、アスコルビン酸 (Sigma, 200 $\mu$ M) BDNF (Invitrogen, 20ng/ml)、bFGF (R&D, 10ng/ml) / SDIA分化培地中で、37℃、24時間インキュベートした。その後、上記の培地よりbFGFを除いた培地でさらに6日間培養した。培養した細胞を4%PFA/PBSで4℃、20分間固定し、PBSで4℃、10分間の洗浄を2回行った。その後、0.3% Triton X-100/PBSで室温、15分間の透過処理を行い、10% normal donkey serum/ブロックエースで室温、20分間のブロッキングを行った。続いて、抗TH抗体 (Chemicon, 0.3  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)、抗 $\beta$ III-tubulin抗体 (BABC0, 1/2000、0.5  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で、室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晚反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回

った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、Cy5標識した抗ラビットIgG抗体（いずれもJackson、 $10\mu\text{g/ml}$ 、10% normal donkey serum、2.5%ブロッカー、0.1% Triton X-100/PBS）で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、PBSで室温、5分間洗浄し、封入して観察した。

#### 【0129】

そして、分離した細胞をin vitroで培養した結果、対照である分離していない細胞に比べて明らかに多くのTHタンパク質陽性ドーパミン産生ニューロンが誘導された。したがって、Lrp4陽性細胞は、確かにドーパミンニューロン系列の前駆細胞であり、in vitroで成熟可能であることが明らかになった（図14）。

#### 【0130】

【実施例6】分離したLrp4タンパク質陽性細胞のパーキンソン病モデルマウス線状体への移植

抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の分離を行い、当該細胞のパーキンソン病モデルマウス線状体への移植を行った。

#### 【0131】

まず、SDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー（Invitrogen）を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、実施例4で作製した抗Lrp4モノクローナル抗体（FERM P-20120、およびFERM P-20121）を混合して用いた（培養上清 1/4 希釈ずつ、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地）で4℃、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地で4℃、3分間の洗浄を3回行い、ビオチン標識抗ハムスターIgG抗体（Jackson、 $10\mu\text{g/ml}$ 、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地）で4℃、20分間染色し、同様に洗浄したのち、PE標識ストレプトアビジン（Pharmingen、 $20\mu\text{g/ml}$ 、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地）で4℃、20分間染色し、同様に洗浄した。染色後、フローサイトメーターにてLrp4発現細胞を分離した。

#### 【0132】

次に、分離したLrp4タンパク質陽性細胞をパーキンソン病モデルマウス線状体へ移植し、脳内でのLrp4タンパク質陽性細胞の性状を解析した。

まず、12週齢のマウス（slc）の片側のmedial forebrain bundleに6-OHDA（sigma、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を $1.25\mu\text{l}$ 注入して、中脳から線状体へ投射するドーパミン産生ニューロンを死滅させることにより、パーキンソン病モデルマウスを作製した。モデルマウス作製後2週間目に、6-OHDAを注入した側の線状体にLrp4タンパク質陽性細胞を1匹あたり $3 \times 10^4$ 個移植した。移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、CAGプロモーター（Niwa et al. (1991) Gene. 108: 193-200）制御下でEGFP遺伝子を発現するように遺伝子導入したES細胞をSDIA法によりin vitroにおいて分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、実施例4と同様の方法で抗Lrp4抗体を用いて染色し、セルソーターにより分離して得た。

#### 【0133】

移植後3週間目に10% Urethan in saline、 $500\mu\text{l}$ を腹腔内投与して麻酔をかけ、麻酔が効いた後、開胸して、左心室より生理食塩水（大塚）30 mlを注入して灌流した後、4% PFA/PBS(-) 30 mlで灌流固定した。固定後、脳を取り出して、更に8時間、4% PFA/PBS(-)中で浸漬固定を行った。その後、2 mm厚にスライスし、20-40% ショ糖/PBS(-)中で一晩置換し、OCT中に包埋した。厚さ10-12  $\mu\text{m}$ の切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(-)で再び湿潤させた。その後、ブロッッキング（10% normal donkey serum/ブロッカー）を室温、20分間行い、抗GFP抗体（Molecular probes、 $20\mu\text{g/ml}$ 、10% normal donkey serum、10% ブロッカー/PBS）、抗MAP2抗体（Sigma、マウス腹水、100倍希釈、10% normal donkey serum、10% ブロッカー/PBS）または抗TH抗体（Chemicon、 $1\mu\text{g/ml}$ 、10% normal donkey serum、10% ブロッカー/PBS）を室温、1時間反応させた後、さらに4℃、一晩反応させた。その後、0.1% Triton X-100/PBS(-)で、室温、10分間の洗浄を4回行った。次に、Alexa Fluor438標識抗ウサギIgG



抗体 (Molecular probes、4  $\mu$ g/ml、10 % normal donkey serum、10 % ブロックエース/PBS)、Cy3標識抗マウスIgG抗体、(Jackson、10  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、10% ブロックエース/PBS) またはCy5標識抗ヒツジIgG抗体、(Jackson、10  $\mu$ g/ml、10% normal donkey serum、10%ブロックエース/PBS)を室温、1時間反応させた後、同様に洗浄を行い、PBS(-)によって室温、10分間洗浄し、封入した。

そして、免疫組織染色による各種マーカー発現解析を行った。

#### 【0134】

その結果、まず、移植したマウスの線状体内にEGFP陽性細胞が認められた(表1)。このことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、パーキンソン病モデルマウスの線状体において、生着しているものと考えられる。

また、生着したほとんどの細胞は、成熟したニューロンのマーカーであるMAP2陽性であり、EGFP陽性の軸索が線状体内に長く伸展している様子も認められた(表1および図16)。

#### 【0135】

【表1】

	EGFP+ 細胞	TH+ 細胞	TH+ %
#6 sec.No.20	95	19	20%
#7 sec.No.12	131	21	16%

(表1は、移植したLrp4陽性細胞のTH陽性細胞へのin vivoにおける分化を示す。  
#6 マウスおよび#7 マウスは、6-OHDAによるドーパミン産生ニューロンの破壊後2週間後にLrp4タンパク質陽性細胞を移植され、移植後3週間目に灌流された。)

#### 【0136】

このことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞が神経前駆細胞であったのに対し、生着したほとんどの細胞が成熟した神経細胞へと分化および成熟したことが示された。また、これら生着した細胞の約20%は、TH陽性であったことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞の少なくとも一部は、ドーパミン産生ニューロンへと分化したことが強く示唆された。

#### 【0137】

したがって、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、脳内に移植することによって、ドーパミン産生ニューロンへの分化が可能であり、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、治療に有効であると考えられる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0138】

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する遺伝子として、Lrp4が同定された。より詳細にその発現について調べた結果、Lrp4 mRNAはドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に、Lrp4蛋白質は分裂停止前後の細胞を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞に、特異的に発現していることが確認された。そこで、細胞における該Lrp4 mRNAまたはポリペプチドの発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適したドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択することが可能となった。本発明のようにLrp4をマーカーとして細胞を得た場合には、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、in vitroで最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の方法により得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能である。さらに、該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。特に、Lrp4 mRNAを指標として得られる分裂停止前のドーパミン産生ニューロ

ン増殖前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節(阻害または促進)するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

#### 【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】 Lrp4の構造を模式的に示す図である。TM:膜貫通ドメイン、FRI:frizzledドメイン、LDLa:LDLレセプタードメイン、SR:スカベンジャーレセプタードメイン、Protease:セリンプロテアーゼドメイン。

【図2】 Lrp4及びShhのmRNAのE12.5マウス後脳腹側及び脊髄における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

【図3】 Lrp4、Shh、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

【図4】 Lrp4の中脳における発現パターンを模式的に示す図、並びに、Lrp4、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、Sim-1及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。VZ: ventricular zone、ML: mantle layer。

【図5】 Lrp4のmRNAのE12.5マウス中枢神経系における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。A:矢状面; B:Aの枠内部分の拡大写真; C:Aの赤線位置での断面。D:Lrp4、Shh及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)のmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現を示す。

【図6】 ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4、NCAM、TH及びDATのmRNAの発現時期を模式的に示す図である。

【図7】 ES細胞からのin vitroドーパミン産生ニューロン分化系におけるLrp4の発現について示す。上は、ES細胞からのドーパミン産生ニューロンの分化を模式的に示す図及び写真である。下の写真は、SDIA法によりES細胞よりドーパミン産生ニューロンを分化誘導し、時間を追ってLrp4 mRNAの発現をRT-PCR法で調べた結果を示す。

【図8】 E12.5マウス中脳におけるLrp4蛋白質の発現を示す写真である。

【図9】 SDIA分化細胞におけるLrp4蛋白質の細胞表面での発現を、抗Lrp4抗体を用いてFACS解析した結果を示す。

【図10】 Lrp4陽性細胞における、各種ドーパミン産生ニューロンマーカーの発現を分析したRT-PCRの結果を示す写真である。

【図11】 ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4のmRNA及び蛋白質、並びに、TH mRNAの発現時期を模式的に示す図である。Lrp4発現細胞の中にドーパミン産生ニューロンの増殖可能な前駆細胞と分裂停止した前駆細胞の両方が存在することを示す。

【図12】 Lrp4陽性細胞の分化段階を調べた結果を示す写真である。

【図13】 Lrp4陽性細胞をin vitroにおいて増殖させた結果を示す写真である。

【図14】 Lrp4陽性細胞がドーパミン産生ニューロンへ分化することを示す写真である。

【図15】 抗Lrp4抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

【図16】 移植されたLrp4陽性細胞のin vivoにおける分化を示す写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> EISAI CO., LTD.

<120> Dopaminergic neuronal progenitor marker Lrp4/Corin

<130> E4-A0404Y1

<150> JP 2004-213743

<151> 2004-07-22

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4864

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ctagtcctccc ggcagacggc cctcactcc tatggcttgg cgtcggagac gctggcagtc	60
atgggcaggg ttctctcag cgttcgggtc agctccgtgc ggagagcccg ctgctcttgt	120
cctggggcgt gctacctctc ctgcagagtc cctccaacca ccgccctccg tgcactgaac	180
ggtcttggct gcgcgggggt tccgggggag actgcaggta gagccgtcgg acccggcccc	240
tggggaccc gtggcttccct ctccgggtcc aagttccagg ctcccggcag ctggaaggat	300
tgccttggag ccccgccctgc tccagacgtc ttgagagcag acaggagcgt ggcgagggc	360
tgtcttcaga agctggtagc tgctaacttg ctacgcttcc tcttgctggt gctcatcccc	420
tgcattctgc cctcactgt gctgctggcc atctgtctgt cctttgtggg aacattaaaa	480
agggtttatt tcaaatcaaa tgacagtgaa cctttgggtc ctgatgggga agctcagatg	540
cctgggtgta ttctgtgaaa tacagtttat tatgagaaca caggggcgcc ctctctgccc	600
cccagccagt ccactccagc ctggacaccg agagctcctt ctccagagga ccagagtcac	660
aggaacacaa gcacctgcat gaacatcact cacagccagt gtcaaattct gccctaccac	720
agcacgttgg caccctctct gccaatgtc aaaaacatgg acatggagaa gtctctcaag	780
ttcttcacgt acctccatcg cctcagttgc tatcaacata tctgtctctt cggctgttagc	840

cfcgccttcc ctagtgccgt tgttgatggc gatgacaggc atggctctct accctglaga	900
tctttctgtg aggcctgc aaa agaaggatgc gaaictgtcc tgggaatggt gaactcctcc	960
tggccggatt ccttcagatg ccttcagttt agggaccaca ctgagactaa cagcagtgtc	1020
agaaagagct gcttctcact gcagcaggaa catggaaagc aatcactctg tggagggggc	1080
gagagcttcc tgtgtaccag cgggctctac gcccccaaga agctgcagtg taacggctat	1140
aatgactgtg atgactggag cgacagggcg catgtcaact gcagcaagga tctgtttcac	1200
tgtggcacag gcaagtgcct ccactacagc ctcttgtgtg atgggtacga tgactatggg	1260
gacccgagtg acgagcaaaa ctgtgattgt aatctcaca aagagcatcg cgttggagat	1320
ggcgctgca ttgcggctga gtgggtgtgc gatggggacc atgacttgtt ggacaagtct	1380
gatgaggcca actgctcttg tcacagccag gcccgtgttg aatgcacaag tggacagtgc	1440
atccctagca ccttccagtg tgatggggac gaagactgta aggaiggag tgacgaggag	1500
aactgcagtg acagtacagc gccatgtcca gaaggagaa agggatgctt tggcagttcc	1560
tgcgtcgaat cctgtgctgg tagctctctg tgtgactcag acagcagcct gactaacctc	1620
agtcaatgtg agcccatcac ttgggaactc tgcatgaatt tgcctctaca ccataacat	1680
tatccaaatt accttggcca cagaactcaa aaggaagcgt ccatcagctg ggagtcattc	1740
cttttccctg cctttgtaca aaccaactgt tacaataacc tcatgttttt cgcttgcacc	1800
attttgcttc caaagtgtg tgtgaataca ggaacaacca tcccgcttg cagactcctg	1860
tgtgagcact ccaaagagcg ctgtgagctt gttctgggaa tegtggcct gcagtggcct	1920
gaagacaccg actgcaatca atttccagag gaaagtccag acaatcaaac ttgcctcctg	1980
cccaatgaag atgtggagga atgctctccg agtcacttca aatgccgtc gggacgatgc	2040
gttctgggct ccaggagatg tgacggccag gctgactgtg acgacgacg tgacgaggag	2100
aactgtggtt gtaaagagag agctctttgg gaatgtccat ttaataagca atgtctgaag	2160
catacatiaa tctgcgatgg gtttccagat tctccagaca gtatggatga aaaaaactgc	2220
tcaftttgcc aagacaatga gctggaatgt gccaaccatg agtgtgtgcc gcgtgacctt	2280
tgttgcgacg gatgggtcga ctgctcagac agttctgatg aatggggctg tgtgacctc	2340

tcfaaaaaatg ggaactccctc ctcatltagctg actglttcaca aatctgcgaaa ggaaccaccac	2400
gtgtgtgtctg acggctggcg ggagacgttg agtcagctgg ccctgcaagca gatgggttta	2460
ggagaaccct cctgtaccaa gctgatccca ggacaggaag gccagcagtg gctgaggattg	2520
taccccaact gggagaatct caatgggagc acctgtcagg agctgcttgt atacaggcac	2580
tccctgcccga gcagaagtga gatttccctt ctatgctcca agcaagactg tggccaccgc	2640
ccctgtgccc gaatgaacaa gaggatcctt ggggtcggg ctatgctgc tgggagggtg	2700
ccgtggcagt gctctctgca gagtgaacc agtggacata tctgtggctg tgtcctcatt	2760
gccaagaagt gggctctgac agttgcccat tgccttgaag ggagagaaga cgctgatgtt	2820
tggaaagtga tatttggcat aaacaacctg gaccatccat caggcttcat gcagaccgc	2880
tttgtgaaag ccatcctgct acatccccgt tacagtcgag cagtggtaga ctatgatatc	2940
agcgtggttg agctgagcga tgatatcaat gagacaagct acgtcagacc tgtctgacct	3000
cccagtcagg aggagtatct agaaccagat acgtactgct acatcacagg ctggggccac	3060
atgggcaata aaatgccctt taagctgcag gaggagaggg tccgcattat cccctctggag	3120
cagtgccagt cctattttga catgaagacc atcaccaatc ggaatgatctg tgcctgctat	3180
gagcttgcca ccgtggaact ctgcattgga gacagcggtg ggcctctggt ttgtgaacga	3240
ccggaggagc agtggacatt atttgggtta acttcatggg gctccgtctg cttttccaaa	3300
gttctgggac ctggagtga cagcaatgtg tcttacttig tgggtggat tgaaagacaa	3360
atatatatcc agaccttct ccaaaagaaa tcccaaggat aatcagagac ttgttgggga	3420
aacctacatg gagaatgacc ctctgaaaca gaagcttgct ctgccaagag ctgtacgaac	3480
aggcgtttca cggacaggac gctcaacatg caccgcaaga tctctcctgt ttgtgclaga	3540
tgagttttac tcaggcttta atctctttca acattatcat ttattaattt catgaatcct	3600
tttaaaagca cagagcaaag taggttttgt tattttgcta ggctaacctt gaatgtagt	3660
tgcaattacc aaccataga gacatttggg gctctagggt aacaagtta agaaaagctcc	3720
ttttattact actacaagac acacacggag atacacgctg actgatctcc agtttctgct	3780
taagcccagt ggcttagggg gcacatttca gaactgactt tggagacttg cttttaattt	3840

gtagaaagcc aagagaatat atatgccttt attatttact ctactcttct aaataacttg	3900
aagaaatcat gaaagacaga gaaaggagccc acagtggtga tctagacagt tgaagttgca	3960
agaatgtaaa attctcttagc caaccaaact aacactctga agtaagtaga attctatcct	4020
tctcttatte aaatttaagct taaaatctcc accagatttg tccccgttac tgggaatttt	4080
cggagtatgt cacttagatg actgtgatgt caaaagccag gtcaatcctt gaggaaaata	4140
tttgtttgct tatgtgggaa tgaataagaa tctttccatt ccgcaaaaaca cacaaaataa	4200
aaaggagaaa aaaaattaaa taacattcca caccctaatta attctgaaaa ttagtctgct	4260
tgtattcacc caaaacagaa aagttacaga aatatatttc aaagtgcagc aaaatgttgc	4320
atggagtata taacattttg caatttcccc ctcatgatgt ctaacatccg gatttgccat	4380
ttgcttcatt gataattaaa actaaatttt aaggatgcit ttaagcactg gcccacttta	4440
tgggaatcaa ttcccaaagc aatttagtgt tacaagtatt ttctccact aaaaaatttc	4500
aaaacacaaa ccttcatact aaatttaatta gccagacatg aactatgtaa catgcaaatg	4560
cctttttgaa caagtaggat gcactgttaa acttcaccag caaccaaact gccctagtat	4620
tacttacagg gactacctgc aattttatat gtgtattttg tactcttttt ctagatagtt	4680
caaatgcaaa acattgtttc aacccctatt ctccatgttg ttacaccttt gtccctggaat	4740
ttgttacaaa gtgtgtatag caaatgattg tactgcggtc aggactatat gaaggtttag	4800
gaccatcggg tcggttttgt tataattggt gccacataat taataaaaata ttittagcat	4860
tggg	4864

<210> 2  
 <211> 5810  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2	
ceggcccaagg cgcggtggcg gtggccgggg ctgcggcgcg gggggcgggg cggtcgggcc	60
cgggacaccc cctcccggtc ccttggcggg gcagcgtcgg ctctggcagc actggaggcg	120
gcggcgggcc gaggcgagct tgcggggcgc gcaggccggc gtcacccgga gacgcttccc	180
cctcggggac cctccgcggg ctctccgcc gcgccgtccg gcgggagccg gcgggacccc	240

gggagagcgg cgcgggcggc accatgaggc ggcagtgagg cgcctgctg ctgggcggc	300
tgtctggcgc acacgiacta cctacctgtt cccctctiga ctltactgt gacaatggca	360
agtgcattcc cgcctccctg gtgtgtgacg gggacaacga ctgtgaggat gactcggatg	420
agcaggactg tcccccccg gagtgtgagg agaacgagtt tccctgccag aatggctact	480
gcattccggag tctgtggcac tgcgaltgtg acaatgactg tggcgacaac agcgaltgagc	540
agtgtgacat gcgcaagtgc tccgacaagg agttccgctg tagtgacgga agctgcatg	600
ctgagcattg gtactggcgc ggtgacaccg actgcaaaga tggctccgat gaggagaact	660
gtcccicagc agtgccagcg cccccctgca acctggagga gtccagtgt gcctatggac	720
gttgcattct cgacatctac cactgcgatg ggcacgatga ctgtggagac tggtcagacg	780
agtctgactg ctgtgagtac tctggccagc tgggagccct ccaccagccc tggcgtctg	840
ggagttcat gtgtgacagt ggcctgtgca tcaatgcagg ctggcgtgc gatggtgacg	900
cggactgtga tgaccagtc gatgagcgca actgcaaaca gtccgctgt cactcagggc	960
gtgtgtccg cctgtccctg cgtgtgatg gggaggacga ctgtgcagac aacagcgatg	1020
aagagaactg tgagaataca ggaagcccc aatgtgctt ggaccagttc ctgigtggga	1080
atgggcgtg cattgggcag aggaagctgt gcaacgggtt caacgactgt ggtgacaaca	1140
gcgacgaaa cccacagcag aattgccggc cccggacggg tgaggagaa tgcaatgtta	1200
acaacggctg ctgtgccag aagtgcaga tggatcgggg ggcagtgcag tgtacctgcc	1260
acacaggcta cggctcaca gaggatgggc acacgtgcc aagtgtgaat gaatgtgccg	1320
aggaggggta ttgcagccag ggtgtacca acagcgaagg ggccttccaa tgcctggtgtg	1380
aaacaggcta tgaactacgg cccgaccggc gcagctgcaa ggcctcggg ccagagcctg	1440
tgtgtctgtt cgccaatcgc atcgacatcc ggcagggtgt gccacaccg tctgagtaca	1500
cactgctgct taacaacctg gagaatgcc tggccctiga ttccaccac cgcgcgagc	1560
ttgtcttctg gtcagatgt accctggacc ggtctctcc tggcaacctt aacggcagca	1620
acgtggagga ggtgtgtct actgggctgg agagccaggg gggcctggct gtggattggg	1680
tccatgacaa actctactgg accgactcag gcacctcgag gattgagggt gccaatctgg	1740

atggggccca ccggaagtg ttgctgtagc agaacctgga gaagccccgg gccattgcct	1800
tgcattcccat ggagggtacc atttactgga cagactgggg caacaccccc cgtattgagg	1860
ccctccagcat ggaatggcctt ggaacccgca tcattgccga taccatctc ttctggccca	1920
atggcctcac catcgactat gccgggccc gtagtactg gtagaatgct aagcaccatg	1980
tcatcgagag ggccaatctg gatggggagc accgtaaggc tgcattagc caggtgttg	2040
aagacagcct gtactggaca gactggcaca ccaagagcat caatagcgct aacaaattta	2100
cgggggaagaa ccaggaaatc attcgcaaca aactccacti ccctatggac atccacacct	2160
tgcacccccca ggcgcaacct gcaggaaaaa accgctgigg ggaacaacaac ggaggctgca	2220
cgcacctgtg tctgcccagt ggccagaact acacctgtgc ctgcccact ggcttccgca	2280
agatcagcag ccacgacctg gccagagtc ttgacaagtt cctgcttttl gcccgaagga	2340
tagacatccg tcgaatcagc tttagacacag aggaacctgc tgaatgagtc atcccactgg	2400
ctgacgtacg cagtgctgtg gcccttgact gggactcccc ggaatgaccac gttgactgga	2460
cagatgtcag cactgatacc atcagcaggg ccaagtggga tggaaacagga caggaggstg	2520
tagtggatac cagttiggag agcccagctg gccctggccat tgaatgggtc accaacaac	2580
tgtactggac agatgcaggc acagaccgga ttgaagtagc caacacagat ggcagcatga	2640
gaacagtact catctgggag aaccttgatc gtccctggga catcgtggg gaacctatgg	2700
gcgggtacat gatttgact gactggggtg cgaagcccaa gatgaacga gctggcatgg	2760
atgcctcagg ccgccaagtc attatctctt ctaatctgac ctggcctaatt gggttagcta	2820
ttgattatga gtcccagcgt ctatctggg ctgacgccgg catgaagaca attgaaattg	2880
ctggactgga tggcagtaag aggaagggtc tgattggaag ccagctcccc caccatttg	2940
ggctgacct ctatggagag cgcactcatt ggaatgact gcagaccaag agcatacaga	3000
gcctgaccg gctgacaggg ctggaccggg agactctgca ggagaacctg gaaaacctaa	3060
tggacatcca tgtcttcac cggcgccggc cccagtgct tacaccatgt gctatggaga	3120
atggcggtc tagccacctg tgtcttaggt ccccaaatcc aagcggttc agctgtacct	3180
gccccacagg catcaacctg ctgtctgaig gcaagacctg ctaccaggc atgaacagtt	3240



tccatcattt ccccaggagg atagacattt gcatggcttc cctggacatc ccttattttg	3300
ctgaigtggt ggtaccaatc aacattacca tgaagaacac catlgccatt ggagtagacc	3360
cccaggaaag aaagggtgtac tggcttgaca gcacactgca caggatcagt cgtgccaatc	3420
tggatggctc acagcatgag gacatcatca ccacagggtc acagaccaca gatgggtcgc	3480
cggltgatgc caltggccgg aaagttactt ggacagacac gggaacaaac cggattgaag	3540
tgggcaacct ggacgggtcc atgcggaaag tglitggtgt gcagaacctt gacagtcctc	3600
ggcccatcgt acigtacctt gagatgggtt ttatgtactg gacagactgg ggggagaatg	3660
ccaagitaga gcgggtccgga atggatggct cagaccgcgc ggtgctcacc aacaacaacc	3720
taggatggcc caatggactg actgtggaca aggccagctc ccaactgcta tgggccgatg	3780
cccacaccga gcgaattgag gctgctgacc tgaatggtag caatcggcat acattggtgt	3840
caccggtgca gcacccatat ggcttcaccc tgcctgactc ctatattctac tggactgact	3900
ggcagactcg gagcatccac cgtgctgaca agggctactg cagcaatgtc atcctcgtga	3960
ggtccaaacct gccaggcttc atggacatgc aggcctgtga ccgggcacag ccactagggt	4020
ttaacaagtg cggtctgaga aaiggcggct gctcccacct ctgcctgcct cggccttctg	4080
gcttcctcig tgcctgcccc actggcatcc agctgaaggg agatgggaag acctgtgac	4140
ctctctctga gacctacct cctttctcca gccgtggctc catccggcat atctcactgg	4200
acaccagtga ccacaccgat gtgcatgtcc ctgttcttga gctcaacaal gtcatctccc	4260
tggactatga cagcgtggat ggaaaggctt attacacaga tctgttctt gatgttatca	4320
ggcagacaga cctgaacggc agcaacatgg aggcagtgat cgggcgaggg ctgaagacca	4380
ctgacgggtt ggcagtggac tgggtggcca ggaacctgia ctggacagac acaggtcgaa	4440
ataccattga ggcgtccagg ctggatgggt cctgccgcaa agtactgac aacaatagcc	4500
tggatgagcc ccgggccatt gctgttttcc ccaggaaagg gtacctcttc tggacagact	4560
ggggccacat tgccaagatc gaacgggcaa acttggatgg ttctgagcag aaggctctca	4620
tcaacacaga cctgggttgg cccaatggcc ttaccttgg ctatgatacc cgcaggatct	4680
actgggttga tgcgcattct gaccggatcg agagtgcctga cctcaatggg aaactgcggc	4740

```

aggctcttggg cagccatgtg tcccacccct ttgccctcac acagcaagac aggtggatct 4800
actggacaga ctggcagacc aagtcattcc agcgtgttga caaaiaactca ggccggaaca 4860
aggagacagt gctggcaaat gtggaaggac tcatggatat catcgttggt tcccctcagc 4920
ggcagacagg gaccaatgcc tctggttga acaatgttg ctgcacccac ctctacttgg 4980
ccagagccctc ggacttcgta tgtgccctgc ctgacgaacc tgatagccgg ccttgcctcc 5040
ttgtgcctgg cctgggtacca ccagctccta gggctactgg catgagtga aagagccag 5100
tgctacccaa cacaccacct accaccttgt attcttcaac caccgggacc cgcacgtctc 5160
tggaggagggt ggaaggagga tgccttga aa ggaatgccag gctgggacctc tgtgcacgtt 5220
ccaatgacgc tgttcttgc tctccagggg aaggacttca tctcagctac gccattgggtg 5280
gactcctcag tattctgctg attttgggtg tgaattgcagc ttgatgtctg tacagacaca 5340
aaaaatccaa gttcactgat cctggaatgg ggaacctcac ctacagcaac cctctctacc 5400
gaacatccac acaggaagtg aagattgaag caatcccaa accagccatg tacaaccagc 5460
tgtgtataa gaaagagggg gggcctgacc ataactacac caaggagag atcaagatcg 5520
tagagggagt ctgccctctg tciggggatg atgctgagtg ggaatgacctc aagcaactgc 5580
gaagctcacc gggggggcctc ctccgggac atgtatgcat gaagacagac acggtgtcca 5640
tccagggcag ctctggctcc ctggatgaca cagagacgga gcagctgtta caggaagagc 5700
agtcagagtg tagcagctc catactgcag ccactccaga aagacgaggc tctctaccag 5760
acacgggctg gaaacatgaa cgcgaagctc cctcagagag ccaggtctaa 5810

```

```

<210> 3
<211> 1113
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```
<400> 3
```

```

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala
1              5              10              15

```

```
Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro
```

20

25

30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro  
 35 40 45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg  
 50 55 60

Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp  
 65 70 75 80

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser  
 85 90 95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg  
 100 105 110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu  
 115 120 125

Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe  
 130 135 140

Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val  
 145 150 155 160

Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala  
 165 170 175

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala  
 180 185 190

Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn  
 195 200 205

Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala  
 210 215 220

Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys  
225 230 235 240

Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu  
245 250 255

Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp  
260 265 270

Arg His Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu  
275 280 285

Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser  
290 295 300

Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val  
305 310 315 320

Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu  
325 330 335

Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro  
340 345 350

Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp  
355 360 365

Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly  
370 375 380

Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly  
385 390 395 400

Asp Pro Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His  
405 410 415

Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly

420

425

430

Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His  
 435 440 445

Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Thr Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr  
 450 455 460

Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu  
 465 470 475 480

Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys  
 485 490 495

Phe Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp  
 500 505 510

Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu  
 515 520 525

Glu Leu Cys Met Asn Leu Leu Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr  
 530 535 540

Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser  
 545 550 555 560

Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe  
 565 570 575

Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln  
 580 585 590

Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys  
 595 600 605

Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp  
 610 615 620

Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu  
625                      630                      635                      640

Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg  
645                      650                      655

Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp  
660                      665                      670

Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala  
675                      680                      685

Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile  
690                      695                      700

Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys  
705                      710                      715                      720

Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val  
725                      730                      735

Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser  
740                      745                      750

Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser  
755                      760                      765

Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp  
770                      775                      780

Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu  
785                      790                      795                      800

Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln  
805                      810                      815

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu

820

825

830

Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile  
 835 840 845

Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg  
 850 855 860

Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp  
 865 870 875 880

Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly  
 885 890 895

Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe  
 900 905 910

Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn  
 915 920 925

Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr  
 930 935 940

Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile  
 945 950 955 960

Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg  
 965 970 975

Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr  
 980 985 990

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys  
 995 1000 1005

Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln  
 1010 1015 1020

Ser Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala  
1025 1030 1035

Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly  
1040 1045 1050

Gly Pro Leu Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe  
1055 1060 1065

Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly  
1070 1075 1080

Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu  
1085 1090 1095

Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly  
1100 1105 1110

<210> 4  
<211> 1848  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Gln Trp Gly Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Cys Ala  
1 5 10 15

His Val Leu Pro Thr Cys Ser Pro Leu Asp Phe His Cys Asp Asn Gly  
20 25 30

Lys Cys Ile Arg Arg Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Glu  
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Glu Gln Asp Cys Pro Pro Arg Glu Cys Glu Glu Asp  
50 55 60

Glu Phe Pro Cys Gln Asn Gly Tyr Cys Ile Arg Ser Leu Trp His Cys  
65 70 75 80



Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Cys Asp Met  
85 90 95

Arg Lys Cys Ser Asp Lys Glu Phe Arg Cys Ser Asp Gly Ser Cys Ile  
100 105 110

Ala Glu His Trp Tyr Cys Asp Gly Asp Thr Asp Cys Lys Asp Gly Ser  
115 120 125

Asp Glu Glu Asn Cys Pro Ser Ala Val Pro Ala Pro Pro Cys Asn Leu  
130 135 140

Glu Glu Phe Gln Cys Ala Tyr Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ile Tyr His  
145 150 155 160

Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys Gly Asp Trp Ser Asp Glu Ser Asp Cys  
165 170 175

Cys Glu Tyr Ser Gly Gln Leu Gly Ala Ser His Gln Pro Cys Arg Ser  
180 185 190

Gly Glu Phe Met Cys Asp Ser Gly Leu Cys Ile Asn Ala Gly Trp Arg  
195 200 205

Cys Asp Gly Asp Ala Asp Cys Asp Asp Gln Ser Asp Glu Arg Asn Cys  
210 215 220

Lys Gln Phe Arg Cys His Ser Gly Arg Cys Val Arg Leu Ser Trp Arg  
225 230 235 240

Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Ala Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn Cys  
245 250 255

Glu Asn Thr Gly Ser Pro Gln Cys Ala Leu Asp Gln Phe Leu Cys Trp  
260 265 270

Asn Gly Arg Cys Ile Gly Gln Arg Lys Leu Cys Asn Gly Val Asn Asp  
275 280 285

Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ser Pro Gln Gln Asn Cys Arg Pro Arg  
290 295 300

Thr Gly Glu Glu Asn Cys Asn Val Asn Asn Gly Gly Cys Ala Gln Lys  
305 310 315 320

Cys Gln Met Val Arg Gly Ala Val Gln Cys Thr Cys His Thr Gly Tyr  
325 330 335

Arg Leu Thr Glu Asp Gly His Thr Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala  
340 345 350

Glu Glu Gly Tyr Cys Ser Gln Gly Cys Thr Asn Ser Glu Gly Ala Phe  
355 360 365

Gln Cys Trp Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Arg Pro Asp Arg Arg Ser  
370 375 380

Cys Lys Ala Leu Gly Pro Glu Pro Val Leu Leu Phe Ala Asn Arg Ile  
385 390 395 400

Asp Ile Arg Gln Val Leu Pro His Arg Ser Glu Tyr Thr Leu Leu Leu  
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Asn Ala Ile Ala Leu Asp Phe His His Arg Arg Glu  
420 425 430

Leu Val Phe Trp Ser Asp Val Thr Leu Asp Arg Ile Leu Arg Ala Asn  
435 440 445

Leu Asn Gly Ser Asn Val Glu Glu Val Val Ser Thr Gly Leu Glu Ser  
450 455 460

Pro Gly Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Asp Lys Leu Tyr Trp Thr  
465 470 475 480

Asp Ser Gly Thr Ser Arg Ile Glu Val Ala Asn Leu Asp Gly Ala His  
485 490 495

Arg Lys Val Leu Leu Trp Gln Asn Leu Glu Lys Pro Arg Ala Ile Ala  
500 505 510

Leu His Pro Met Glu Gly Thr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Asn Thr  
515 520 525

Pro Arg Ile Glu Ala Ser Ser Met Asp Gly Ser Gly Arg Arg Ile Ile  
530 535 540

Ala Asp Thr His Leu Phe Trp Pro Asn Gly Leu Thr Ile Asp Tyr Ala  
545 550 555 560

Gly Arg Arg Met Tyr Trp Val Asp Ala Lys His His Val Ile Glu Arg  
565 570 575

Ala Asn Leu Asp Gly Ser His Arg Lys Ala Val Ile Ser Gln Val Phe  
580 585 590

Glu Asp Ser Leu Tyr Trp Thr Asp Trp His Thr Lys Ser Ile Asn Ser  
595 600 605

Ala Asn Lys Phe Thr Gly Lys Asn Gln Glu Ile Ile Arg Asn Lys Leu  
610 615 620

His Phe Pro Met Asp Ile His Thr Leu His Pro Gln Arg Gln Pro Ala  
625 630 635 640

Gly Lys Asn Arg Cys Gly Asp Asn Asn Gly Gly Cys Thr His Leu Cys  
645 650 655

Leu Pro Ser Gly Gln Asn Tyr Thr Cys Ala Cys Pro Thr Gly Phe Arg  
660 665 670

Lys	Ile	Ser	Ser	His	Ala	Cys	Ala	Gln	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Leu	675	680	685	
Phe	Ala	Arg	Arg	Met	Asp	Ile	Arg	Arg	Ile	Ser	Phe	Asp	Thr	Glu	Asp	690	695	700	
Leu	Ser	Asp	Asp	Val	Ile	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Ser	Ala	Val	Ala	705	710	715	720
Leu	Asp	Trp	Asp	Ser	Arg	Asp	Asp	His	Val	Tyr	Trp	Thr	Asp	Val	Ser	725	730	735	
Thr	Asp	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Lys	Trp	Asp	Gly	Thr	Gly	Gln	Glu	Val	740	745	750	
Val	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Glu	Ser	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Asp	Trp	755	760	765	
Val	Thr	Asn	Lys	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Arg	Ile	Glu	770	775	780	
Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser	Met	Arg	Thr	Val	Leu	Ile	Trp	Glu	Asn	785	790	795	800
Leu	Asp	Arg	Pro	Arg	Asp	Ile	Val	Val	Glu	Pro	Met	Gly	Gly	Tyr	Met	805	810	815	
Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Gly	Ala	Ser	Pro	Lys	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Met	820	825	830	
Asp	Ala	Ser	Gly	Arg	Gln	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Asn	Leu	Thr	Trp	Pro	835	840	845	
Asn	Gly	Leu	Ala	Ile	Asp	Tyr	Gly	Ser	Gln	Arg	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp	850	855	860	
Ala	Gly	Met	Lys	Thr	Ile	Glu	Phe	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Lys	Arg	865	870	875	880

Lys Val Leu Ile Gly Ser Gln Leu Pro His Pro Phe Gly Leu Thr Leu  
885 890 895

Tyr Gly Glu Arg Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln Thr Lys Ser Ile Gln  
900 905 910

Ser Ala Asp Arg Leu Thr Gly Leu Asp Arg Glu Thr Leu Gln Glu Asn  
915 920 925

Leu Glu Asn Leu Met Asp Ile His Val Phe His Arg Arg Arg Pro Pro  
930 935 940

Val Ser Thr Pro Cys Ala Met Glu Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys  
945 950 955 960

Leu Arg Ser Pro Asn Pro Ser Gly Phe Ser Cys Thr Cys Pro Thr Gly  
965 970 975

Ile Asn Leu Leu Ser Asp Gly Lys Thr Cys Ser Pro Gly Met Asn Ser  
980 985 990

Phe Leu Ile Phe Ala Arg Arg Ile Asp Ile Arg Met Val Ser Leu Asp  
995 1000 1005

Ile Pro Tyr Phe Ala Asp Val Val Val Pro Ile Asn Ile Thr Met  
1010 1015 1020

Lys Asn Thr Ile Ala Ile Gly Val Asp Pro Gln Glu Gly Lys Val  
1025 1030 1035

Tyr Trp Ser Asp Ser Thr Leu His Arg Ile Ser Arg Ala Asn Leu  
1040 1045 1050

Asp Gly Ser Gln His Glu Asp Ile Ile Thr Thr Gly Leu Gln Thr  
1055 1060 1065

Thr Asp Gly Leu Ala Val Asp Ala Ile Gly Arg Lys Val Tyr Trp  
1070 1075 1080

Thr Asp Thr Gly Thr Asn Arg Ile Glu Val Gly Asn Leu Asp Gly  
1085 1090 1095

Ser Met Arg Lys Val Leu Val Trp Gln Asn Leu Asp Ser Pro Arg  
1100 1105 1110

Ala Ile Val Leu Tyr His Glu Met Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp  
1115 1120 1125

Trp Gly Glu Asn Ala Lys Leu Glu Arg Ser Gly Met Asp Gly Ser  
1130 1135 1140

Asp Arg Ala Val Leu Ile Asn Asn Asn Leu Gly Trp Pro Asn Gly  
1145 1150 1155

Leu Thr Val Asp Lys Ala Ser Ser Gln Leu Leu Trp Ala Asp Ala  
1160 1165 1170

His Thr Glu Arg Ile Glu Ala Ala Asp Leu Asn Gly Ala Asn Arg  
1175 1180 1185

His Thr Leu Val Ser Pro Val Gln His Pro Tyr Gly Leu Thr Leu  
1190 1195 1200

Leu Asp Ser Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln Thr Arg Ser Ile  
1205 1210 1215

His Arg Ala Asp Lys Gly Thr Gly Ser Asn Val Ile Leu Val Arg  
1220 1225 1230

Ser Asn Leu Pro Gly Leu Met Asp Met Gln Ala Val Asp Arg Ala  
1235 1240 1245

Gln Pro Leu Gly Phe Asn Lys Cys Gly Ser Arg Asn Gly Gly Cys  
1250 1255 1260

Ser His Leu Cys Leu Pro Arg Pro Ser Gly Phe Ser Cys Ala Cys  
1265 1270 1275

Pro Thr Gly Ile Gln Leu Lys Gly Asp Gly Lys Thr Cys Asp Pro  
1280 1285 1290

Ser Pro Glu Thr Tyr Leu Leu Phe Ser Ser Arg Gly Ser Ile Arg  
1295 1300 1305

Arg Ile Ser Leu Asp Thr Ser Asp His Thr Asp Val His Val Pro  
1310 1315 1320

Val Pro Glu Leu Asn Asn Val Ile Ser Leu Asp Tyr Asp Ser Val  
1325 1330 1335

Asp Gly Lys Val Tyr Tyr Thr Asp Val Phe Leu Asp Val Ile Arg  
1340 1345 1350

Arg Ala Asp Leu Asn Gly Ser Asn Met Glu Thr Val Ile Gly Arg  
1355 1360 1365

Gly Leu Lys Thr Thr Asp Gly Leu Ala Val Asp Trp Val Ala Arg  
1370 1375 1380

Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Thr Gly Arg Asn Thr Ile Glu Ala Ser  
1385 1390 1395

Arg Leu Asp Gly Ser Cys Arg Lys Val Leu Ile Asn Asn Ser Leu  
1400 1405 1410

Asp Glu Pro Arg Ala Ile Ala Val Phe Pro Arg Lys Gly Tyr Leu  
1415 1420 1425

Phe Trp Thr Asp Trp Gly His Ile Ala Lys Ile Glu Arg Ala Asn  
1430 1435 1440

Leu Asp Gly Ser Glu Arg Lys Val Leu Ile Asn Thr Asp Leu Gly	1445	1450	1455
Trp Pro Asn Gly Leu Thr Leu Asp Tyr Asp Thr Arg Arg Ile Tyr	1460	1465	1470
Trp Val Asp Ala His Leu Asp Arg Ile Glu Ser Ala Asp Leu Asn	1475	1480	1485
Gly Lys Leu Arg Gln Val Leu Val Ser His Val Ser His Pro Phe	1490	1495	1500
Ala Leu Thr Gln Gln Asp Arg Trp Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln	1505	1510	1515
Thr Lys Ser Ile Gln Arg Val Asp Lys Tyr Ser Gly Arg Asn Lys	1520	1525	1530
Glu Thr Val Leu Ala Asn Val Glu Gly Leu Met Asp Ile Ile Val	1535	1540	1545
Val Ser Pro Gln Arg Gln Thr Gly Thr Asn Ala Cys Gly Val Asn	1550	1555	1560
Asn Gly Gly Cys Thr His Leu Cys Phe Ala Arg Ala Ser Asp Phe	1565	1570	1575
Val Cys Ala Cys Pro Asp Glu Pro Asp Ser Arg Pro Cys Ser Leu	1580	1585	1590
Val Pro Gly Leu Val Pro Pro Ala Pro Arg Ala Thr Gly Met Ser	1595	1600	1605
Glu Lys Ser Pro Val Leu Pro Asn Thr Pro Pro Thr Thr Leu Tyr	1610	1615	1620
Ser Ser Thr Thr Arg Thr Arg Thr Ser Leu Glu Glu Val Glu Gly	1625	1630	1635



Arg Cys Ser Glu Arg Asp Ala Arg Leu Gly Leu Cys Ala Arg Ser  
1640 1645 1650

Asn Asp Ala Val Pro Ala Ala Pro Gly Glu Gly Leu His Ile Ser  
1655 1660 1665

Tyr Ala Ile Gly Gly Leu Leu Ser Ile Leu Leu Ile Leu Val Val  
1670 1675 1680

Ile Ala Ala Leu Met Leu Tyr Arg His Lys Lys Ser Lys Phe Thr  
1685 1690 1695

Asp Pro Gly Met Gly Asn Leu Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Tyr Arg  
1700 1705 1710

Thr Ser Thr Gln Glu Val Lys Ile Glu Ala Ile Pro Lys Pro Ala  
1715 1720 1725

Met Tyr Asn Gln Leu Cys Tyr Lys Lys Glu Gly Gly Pro Asp His  
1730 1735 1740

Asn Tyr Thr Lys Glu Lys Ile Lys Ile Val Glu Gly Ile Cys Leu  
1745 1750 1755

Leu Ser Gly Asp Asp Ala Glu Trp Asp Asp Leu Lys Gln Leu Arg  
1760 1765 1770

Ser Ser Arg Gly Gly Leu Leu Arg Asp His Val Cys Met Lys Thr  
1775 1780 1785

Asp Thr Val Ser Ile Gln Ala Ser Ser Gly Ser Leu Asp Asp Thr  
1790 1795 1800

Glu Thr Glu Gln Leu Leu Gln Glu Glu Gln Ser Glu Cys Ser Ser  
1805 1810 1815

Val His Thr Ala Ala Thr Pro Glu Arg Arg Gly Ser Leu Pro Asp  
1820 1825 1830

Thr Gly Trp Lys His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gln Val  
1835 1840 1845

<210> 5  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 5  
cagctccaca acctacatca ttccgt 26

<210> 6  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 6  
acggaatgat gt 12

<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 7  
gtccatcttc tctctgagac tciggt 26

<210> 8  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 8

accagagtct ca

12

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 9

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 10

acacactcac ag

12

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 11

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 12  
 actgtcacac tg 12

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 13  
 gtcgatgaac ttcgactgic gaicgt 26

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 14  
 acgatcgaca gt 12

<210> 15  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 15  
 tagtctacca ctgctcgact gtaacg 26

<210> 16  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 16  
 cagagtgaac ccagtgagaca tatctg 26

<210> 17  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 17  
gttcccaagg aaagtgtcag agttgg 26

<210> 18  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 18  
gaagctggaa agcctccagg tgttc 26

<210> 19  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 19  
ctccgagcag acaccatgac cttagc 26

<210> 20  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 20  
aggagtaggg ctgtctccc aacctg 26

<210> 21  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 21  
cactcctgtg tctagctgcc agatgc 26

<210> 22  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 22  
agtgcgaaca ccgtagtgtc gacagg 26

<210> 23  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 23  
gatgaagaaag aaggagcaga gtcagg 26

<210> 24  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 24  
attcacttgc tctgactcca ggttgg 26

<210> 25  
<211> 26

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 25  
ccatgaccll tccccctcag cttcta 26

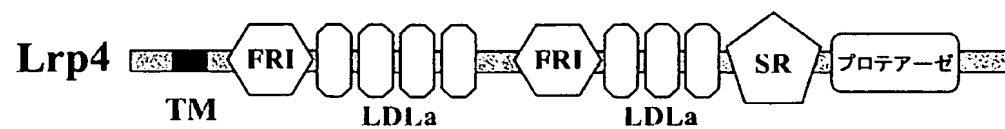
<210> 26  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 26  
tttggctaga aagggtagct ctgagg 26

【書類名】 図面

【図 1】

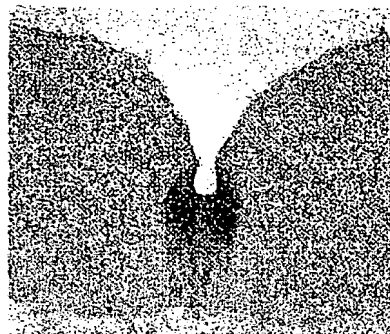
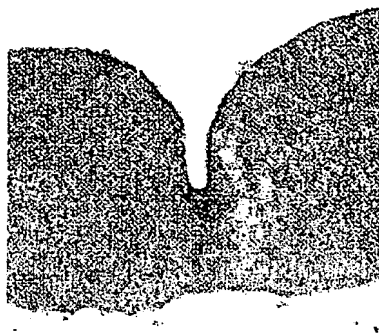


【図 2】

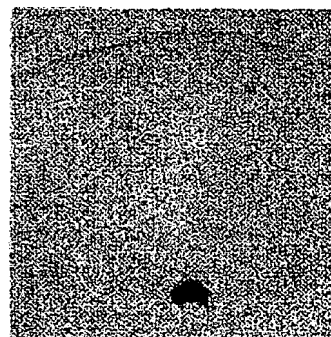
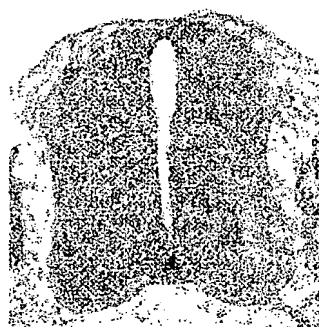
**Lrp4**

**Shh**

後脳

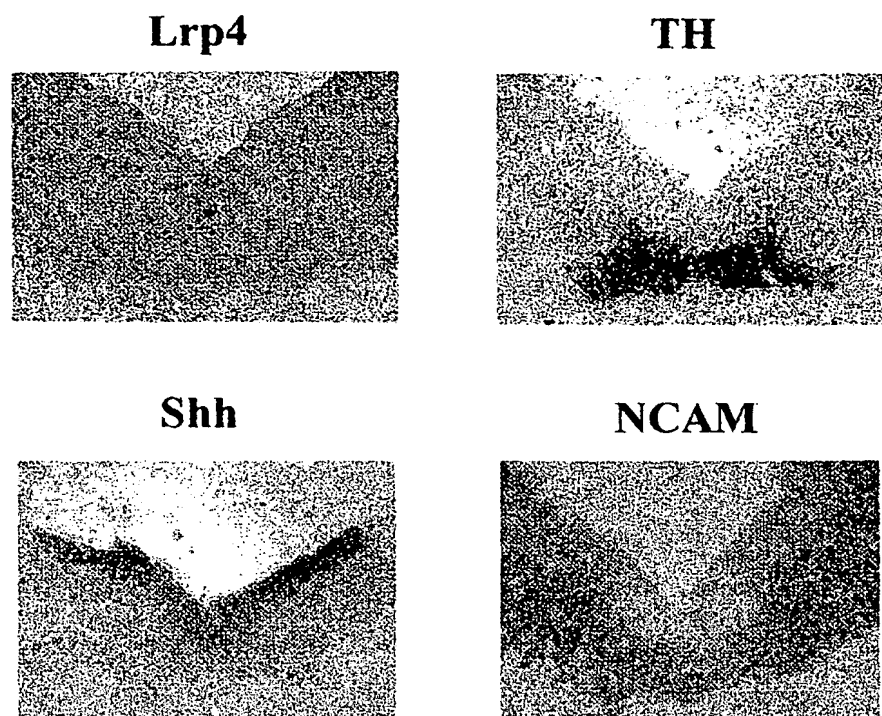


脊髄

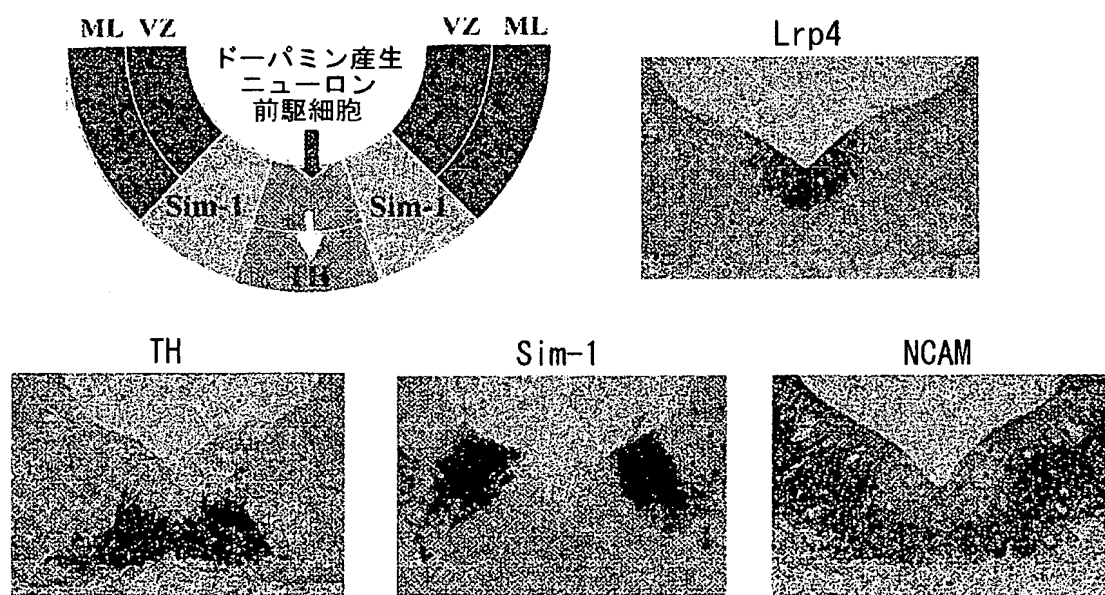




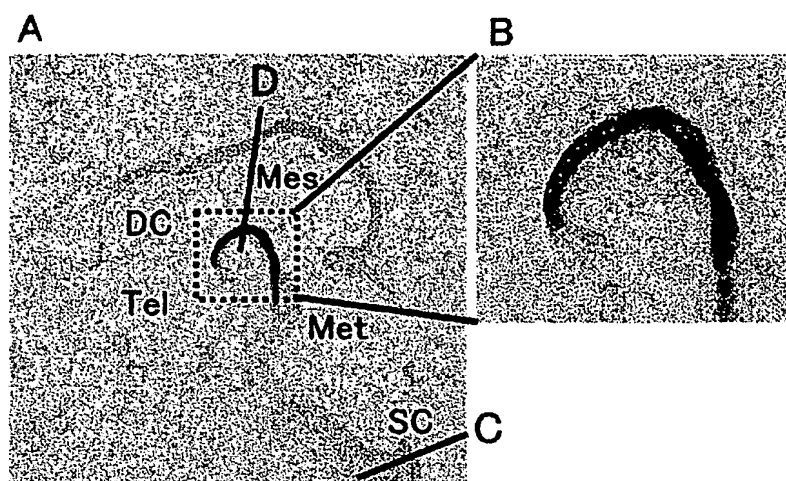
【図3】



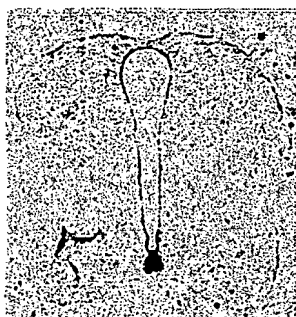
【図4】



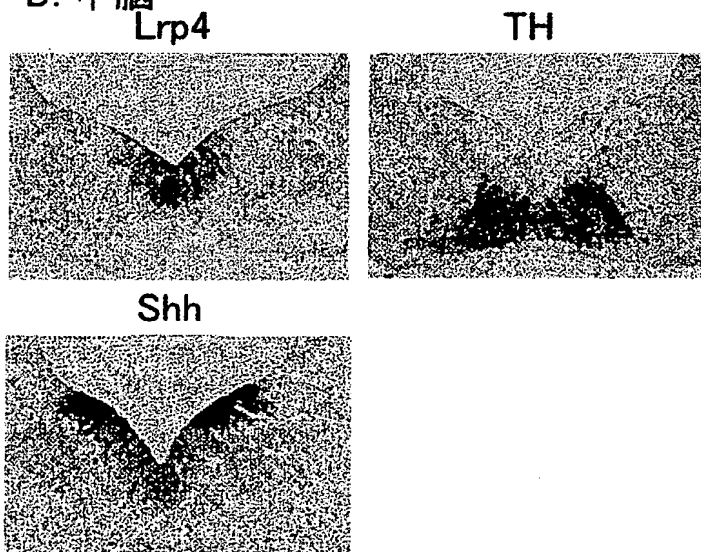
【図 5】



C. 脊髓



D. 中脳



# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP2005/013453

International filing date: 22 July 2005 (22.07.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-315060  
Filing date: 29 October 2004 (29.10.2004)

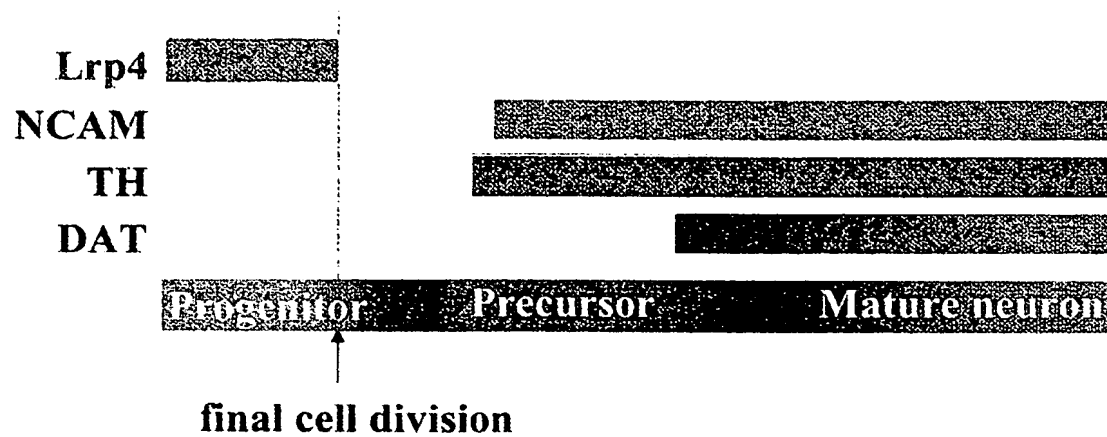
Date of receipt at the International Bureau: 09 December 2005 (09.12.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in  
compliance with Rule 17.1(a) or (b)

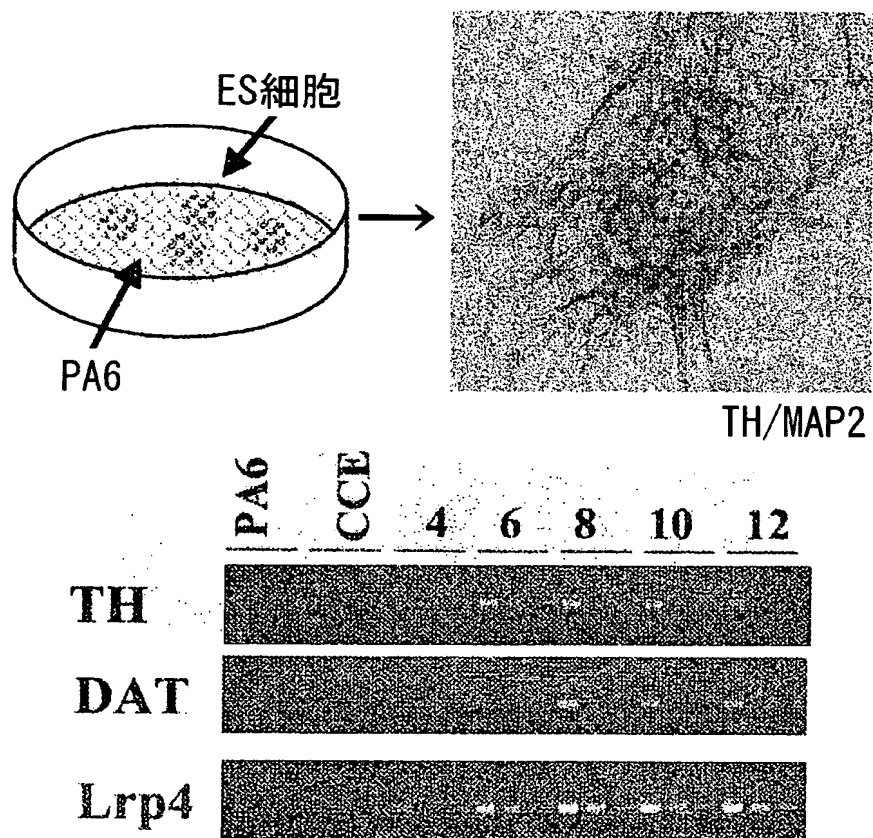


World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

【図 6】

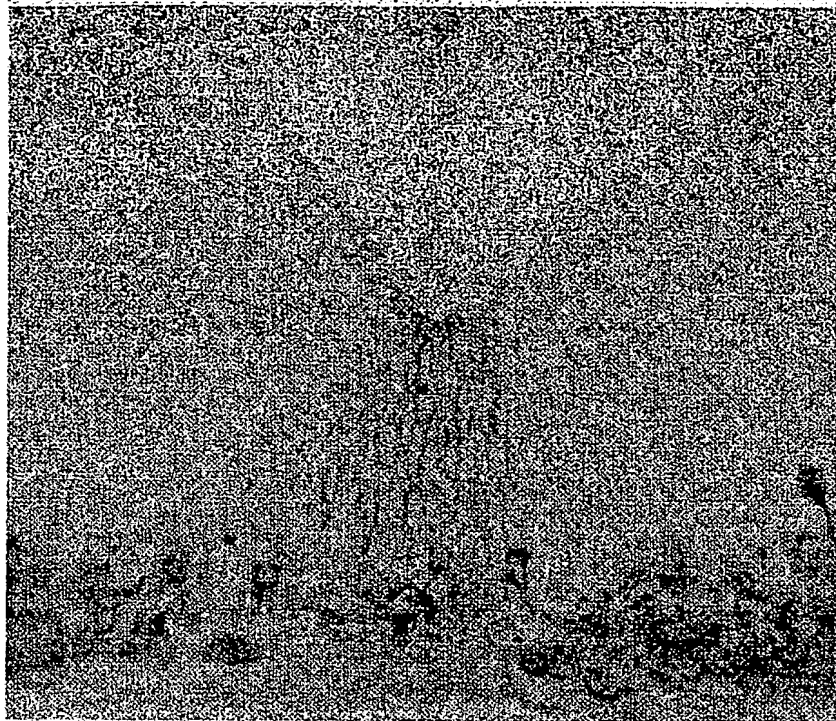


【図 7】

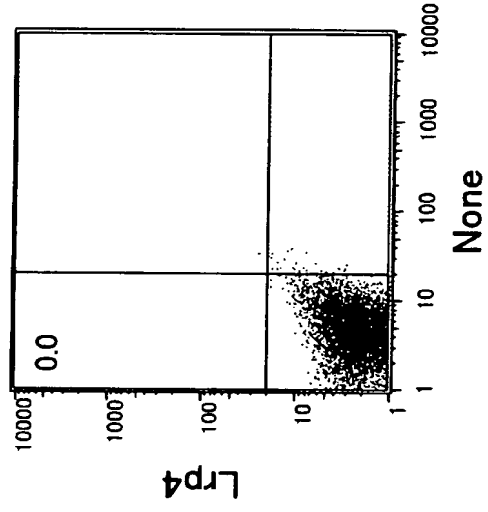


【图 8】

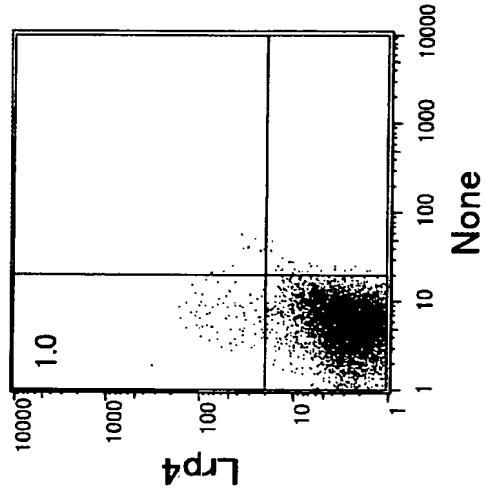
Lrp4/TH



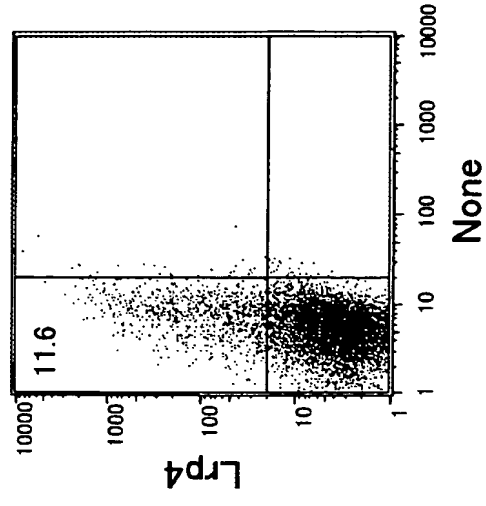
A) 抗体なし

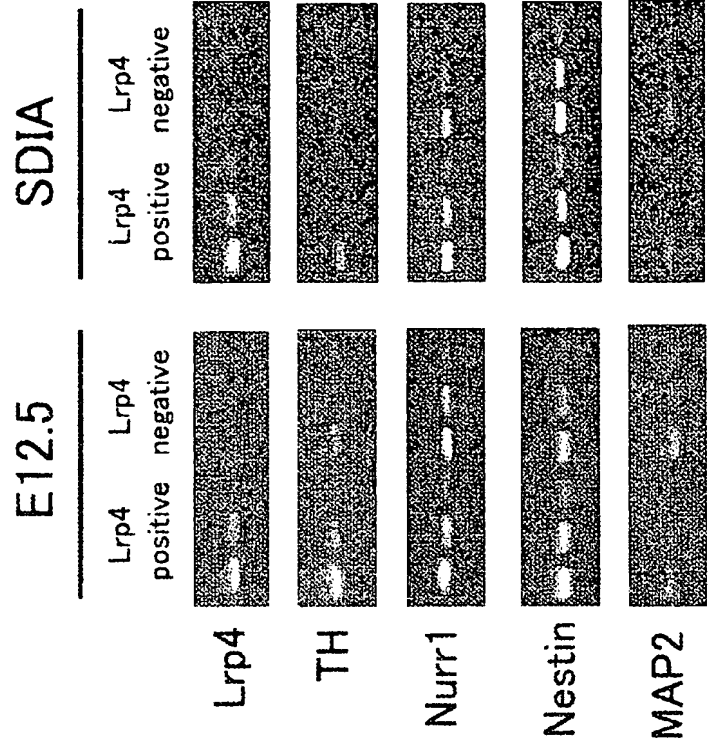
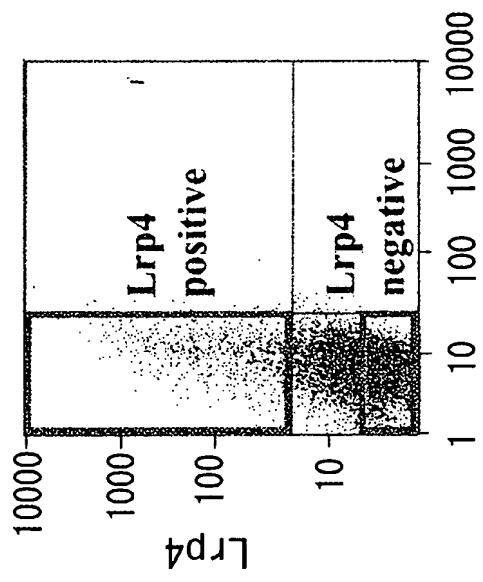


B) 二次抗体のみ

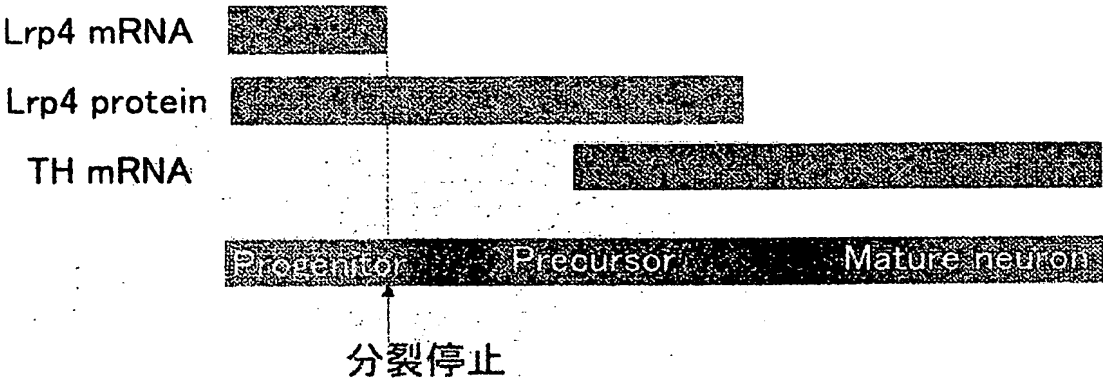


C) 抗Lrp4抗体





【图 11】

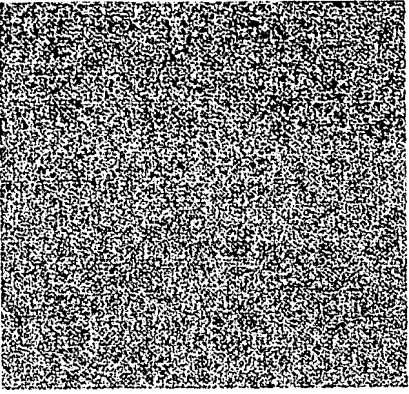
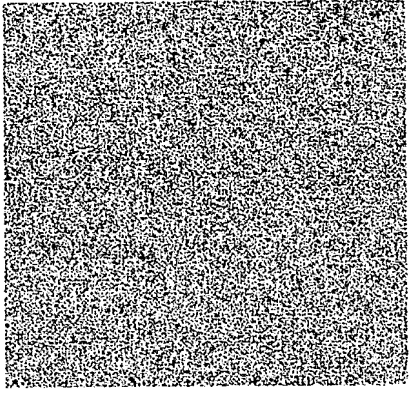
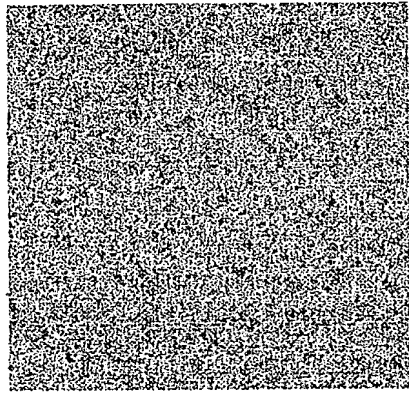




**Nestin**

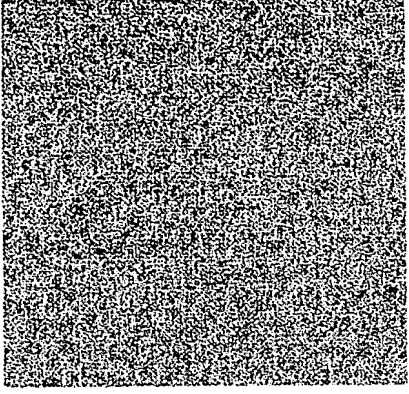
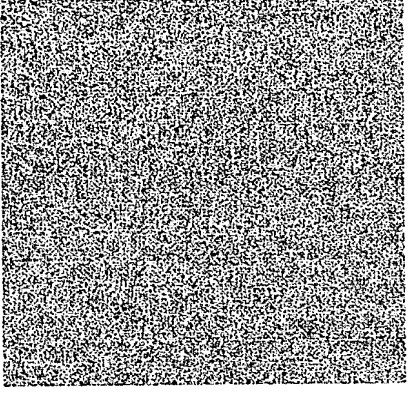
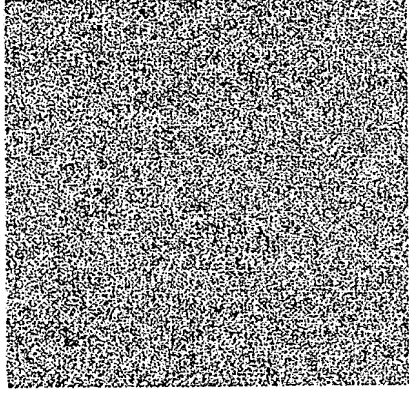
**$\beta$ III-tubulin**

**Merge**

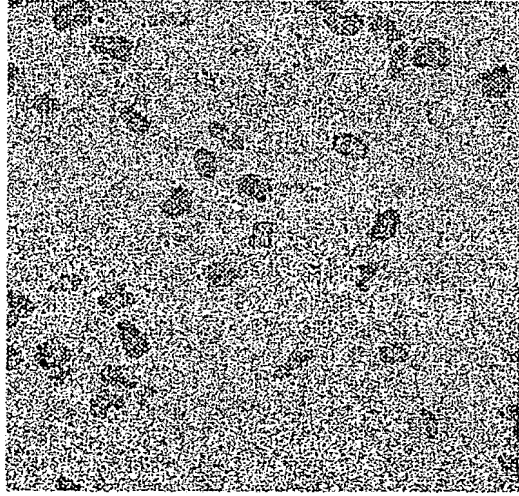


**Cont.**

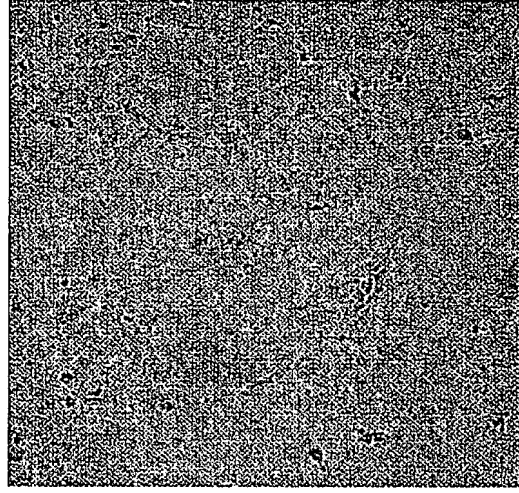
**Sorted  
with  
Lrp4 Ab**



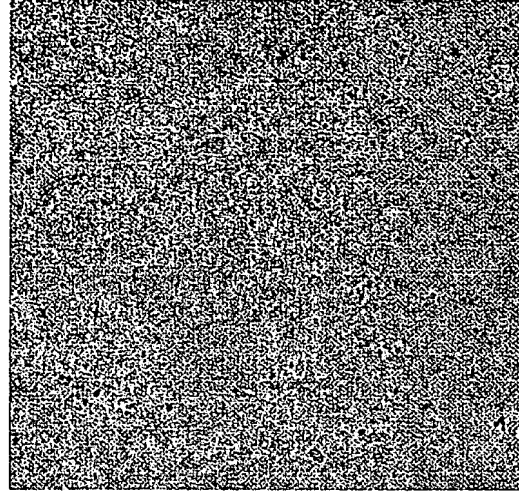
BrdU



transmission

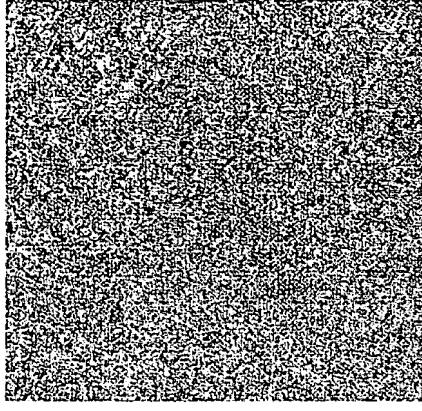


重ね合わせ

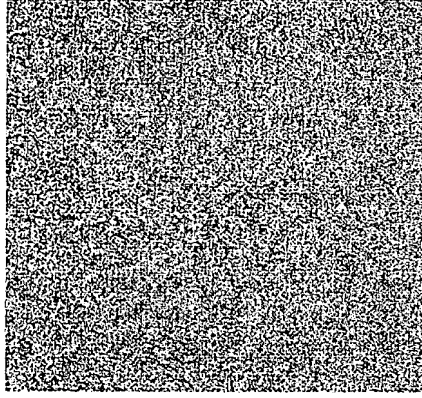


培養：18時間

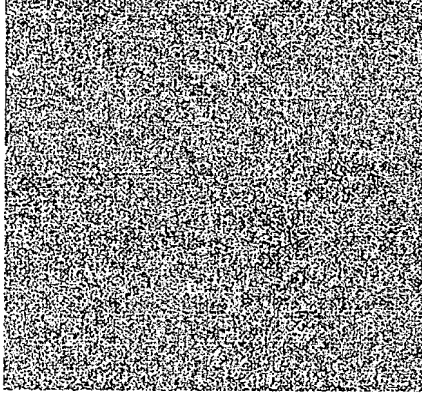
**Merge**



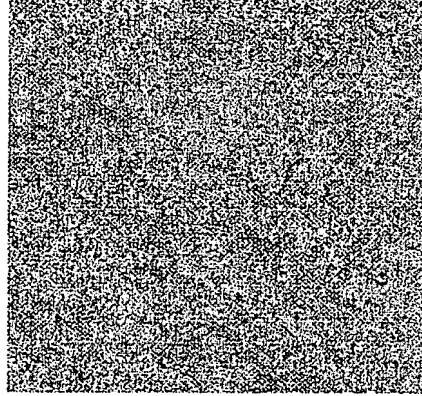
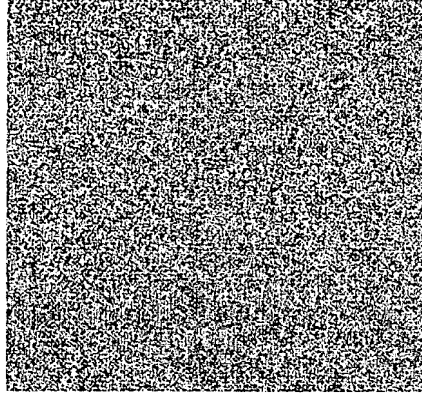
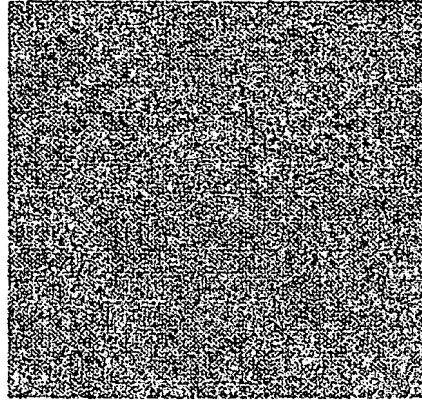
**βIII-tubulin**



**TH**

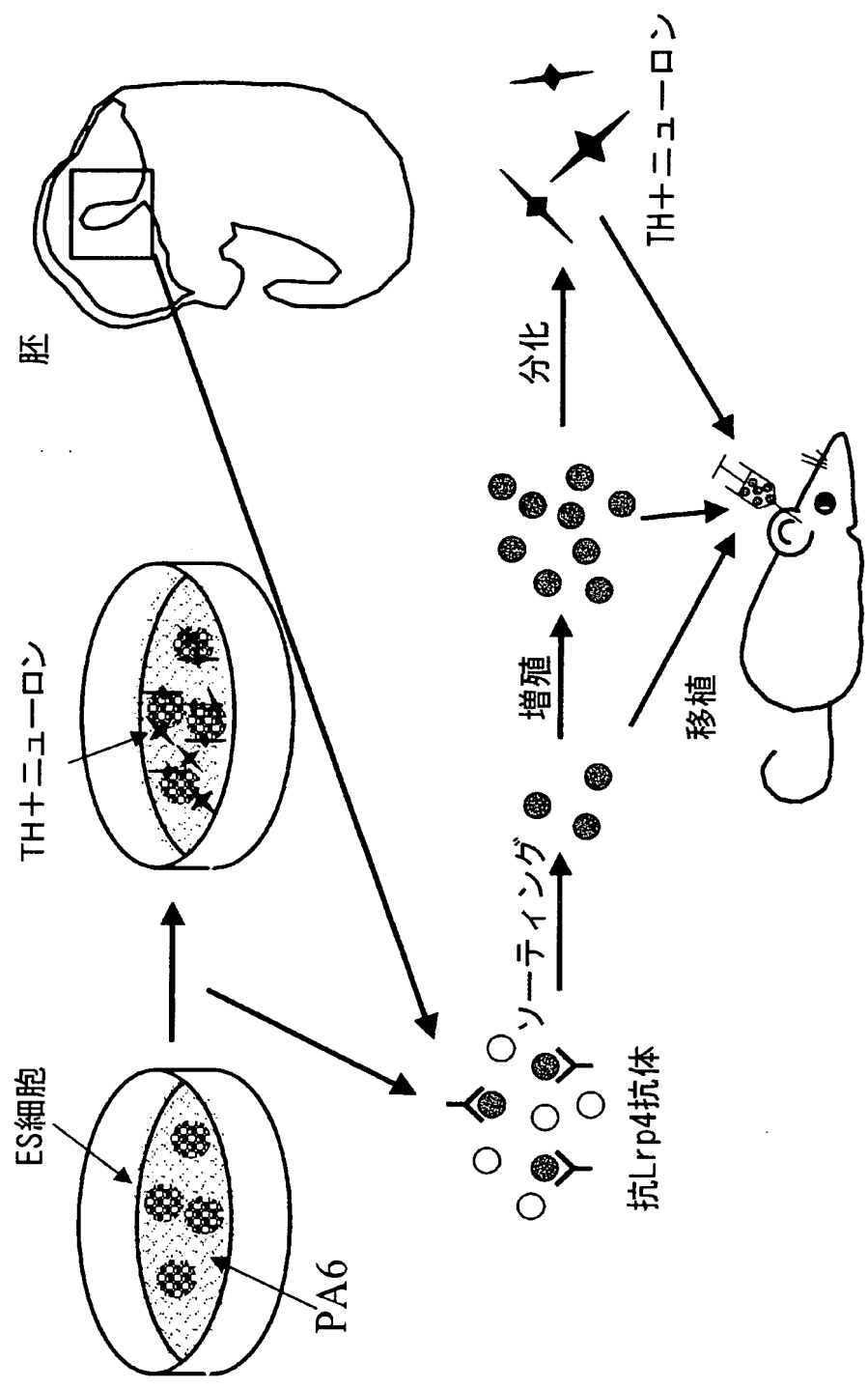


**Cont.**

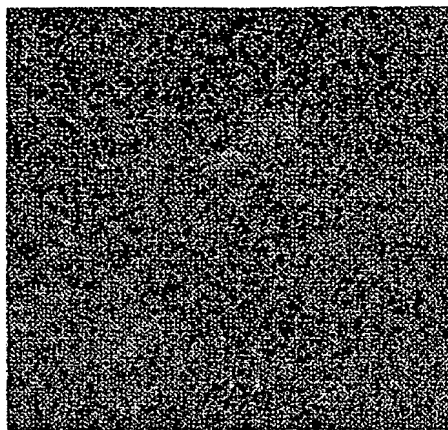
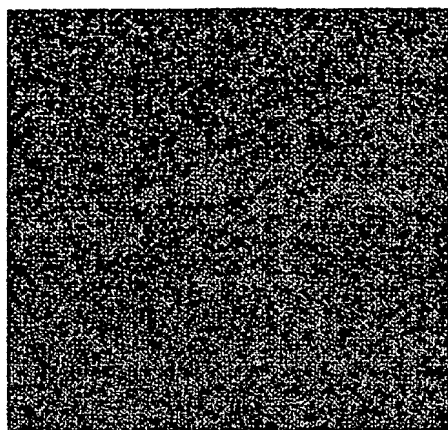


**Sorted  
with  
Lrp4 Ab**

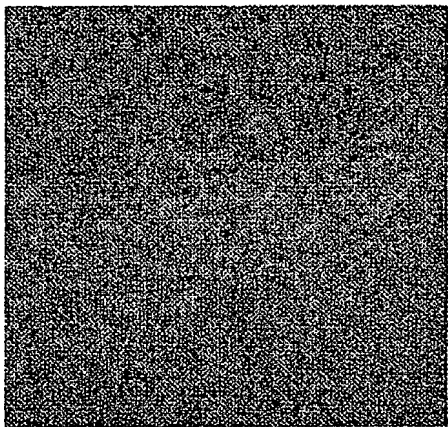
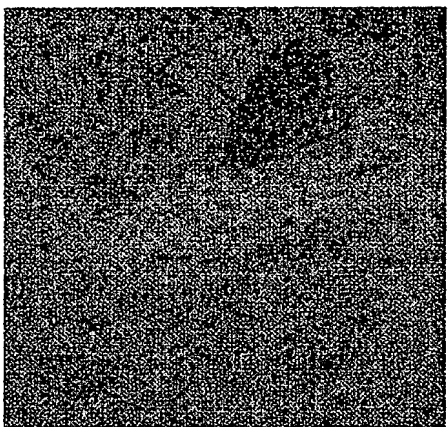
【図15】



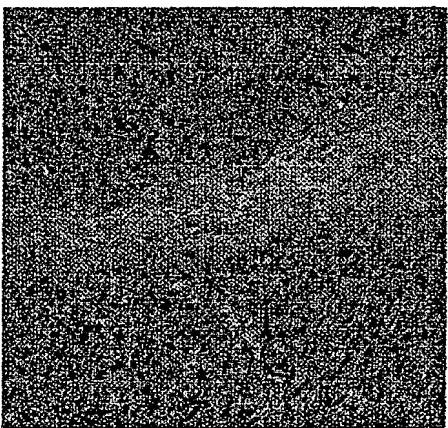
TH



MAP2



EGFP



#6

#7

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経細胞移植治療においては、安全性の面では目的の細胞種のみからなる細胞群、そして腫瘍形成の危険性を考慮すれば分裂停止後の神経細胞が好ましいと考えられる。さらに、移植先での生存、正しいネットワーク形成能等を考慮するとより早期の前駆細胞により治療効果が増大されると期待される。

【解決手段】 ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子として膜貫通蛋白質をコードするLrp4を同定した。Lrp4 mRNAはドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に、Lrp4蛋白質は分裂停止前後の細胞を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞に、特異的に発現していることが確認された。そこで本発明は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することを可能にする、Lrp4/Corinドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを検出するためのポリヌクレオチドプローブ及び抗体、並びに、それらを用いた前駆細胞の選択方法に関する。細胞における該Lrp4の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となる。

【選択図】 なし

【書類名】	手続補正書
【整理番号】	E:-A0404Y:
【提出日】	平成16年12月 3日
【あて先】	特許庁長官殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2004-315060
【補正をする者】	
【識別番号】	000000217
【氏名又は名称】	エーザイ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100102978
【弁理士】	
【氏名又は名称】	清水 初志
【発送番号】	116796
【手続補正1】	
【補正対象書類名】	特許願
【補正対象項目名】	代理権を証明する書面
【補正方法】	追加
【補正の内容】	
【提出物件の目録】	
【物件名】	委任状 1

【物件名】

委任状

【添付書類】



11

## 委 任 状

平成 16 年 11 月 28 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志  
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲  
を以て代理人として下記事項を委任します。

特願2004-315060

1. 特許出願、特許権の存続期間の延長登録の出願、実用新案登録出願、意匠登録出願、商標（防護標章）登録出願及び商標権（防護標章登録に基づく権利）存続期間更新登録出願に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る商標（防護標章）登録 に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に関する特許法第64条の2第1項の規定による出願公開の請求
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 国内優先権主張の先の出願である 特願2004-213743  
に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の優先権の主張及びその取下げ
1. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所 東京都文京区小石川4-6-10

氏名又は名称 エーザイ株式会社

代表者 代表執行役社長 内藤 晴夫





出願人履歴

0 0 0 0 0 0 2 1 7

19900829

新規登録

5 0 0 1 7 4 4 6 5

東京都文京区小石川4丁目6番10号

エーザイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**